

BIOPELÍCULAS BACTERIANAS DE TUBO-OROTRAQUEAL Y SU SENSIBILIDAD  
ANTIMICROBIANA EN DOS UCIS EN BOGOTÁ, COLOMBIA

REALIZADO POR: ANDRÉS  
FELIPE YEPES VELASCO

TUTORES:

ANA MARGARITA BALDION –  
ANDRES FELIPE BUITRAGO

## **1. Información general del proyecto**

**1.1 Título:** Biopelículas bacterianas de tubo-oro-traqueal y su sensibilidad antimicrobiana en dos UCIs en Bogotá, Colombia

### **1.2 Investigador principal:**

- Margarita Baldión – Fundación Santa Fe de Bogotá.
- Mónica Gabriela Huertas – Corporación Corpogen
- Andrés Felipe Yepes - Fundación Santa Fe de Bogotá.

### **1.3 Coo-investigadores:**

- Erika Cifuentes – Corporación Corpogen
- María Mercedes Zambrano - Corporación Corpogen
- Juan Manuel Anzola - Corporación Corpogen
- Carlos Alvarez – Infectología Clínica Colombia

### **correo electrónico de contacto:**

[mhuertas@corpogen.org](mailto:mhuertas@corpogen.org), [ana.baldion@fsfb.org.co](mailto:ana.baldion@fsfb.org.co), [mzambrano@corpogen.org](mailto:mzambrano@corpogen.org),  
[juan.anzola@corpogen.org](mailto:juan.anzola@corpogen.org), [yepespipe@hotmail.com](mailto:yepespipe@hotmail.com).

### **1.4. Nombre del Grupo de Investigación (GrupLAC):**

- Genética Molecular – Corporación Corpogen- COL0006714
- Bioinformática y Biología Computacional -CorpoGen -COL0142091
- BIOS Centro de Bioinformática y Biología Computacional de Colombia (CBBC) - COL0133118
- Departamento de Patología FSFB – Universidad de los Andes – Enfermedades Complejas - Grupo de investigación de la Fundación Santafe

### **1.5. Total de investigadores (número): 7**

### **1.6 Asesor metodológico:**

Dra. Margarita Baldion - Fundación Santa fe de Bogotá

Dr. Alfonso Benítez Páez Microbial Ecology, Nutrition & Health Research Unit Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC). Valencia. España. (Asesor Internacional).

### **1.7 Asesor Temático:**

Dr. Andrés Buitrago, Medico Especialista en Cardiología. Fundación Santafe de Bogotá

## 2. Contenido

<b>1. INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO</b>	<b>0</b>
1.2 INVESTIGADOR PRINCIPAL:	0
1.3 COO-INVESTIGADORES:	0
1.4. NOMBRE DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN (GRUPLAC):	0
1.5. TOTAL DE INVESTIGADORES (NÚMERO): 6	0
1.6 ASESOR METODOLÓGICO:	0
1.7 ASESOR TEMÁTICO:	0
<b>3. RESUMEN DEL PROYECTO:</b>	<b>2</b>
<b>4. DESCRIPTORES DEL PROYECTO:</b>	<b>3</b>
4.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE:	4
4.2.1.2 Factores que promueven la formación de biopelícula a nivel clínico	6
4.2.1.3 Formación de biopelículas sobre tubo orotraqueal	7
4.2.1.4 Diversidad microbiana y resistencia a antibióticos de la flora asociada a la biopelícula sobre tubo orotraqueal.	7
4.2.1.5 Microbioma vía aérea	8
4.2.1.6 Neumonía asociada a ventilación	9
4.2.2 ESTADO DEL ARTE	9
4.2.2.1 Análisis situacional de la infección nosocomial y neumonía asociada a ventilador	9
4.2.2.2 Flora asociada a TO, microorganismos prevalentes y reportados.	11
4.3 OBJETIVOS:	13
4.3.1 OBJETIVO GENERAL	13
4.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4.4 METODOLOGÍA:	13
4.4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO: ESTUDIO DE TIPO DESCRIPTIVO DE CORTE TRANSVERSAL.	13
4.4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO:	13
4.4.3 MUESTRA:	14
4.4.4 VARIABLES DE ESTUDIO	14
4.4.5. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	19
4.4.5.1 Toma y almacenaje de la muestra	19
4.4.5.2 Obtención de aislamientos bacterianos	19
4.4.5.3 Extracción de ADN, librerías y secuenciación.	19
4.4.5.4 Análisis de secuencias - perfil taxonómico de la comunidad (16SrRNA)	20
4.4.5.5 Análisis de formación de biopelículas y determinación de MBEC	20
4.4.5.5.1 Determinación de biopelícula: Cultivo estático	20
4.4.5.5.2 Determinación de la concentración mínima bactericida en biopelículas (MBC <sub>B</sub> )	21
4.4.6 Ensayos análisis de resistencia bacteriana	21
4.4.7 Análisis estadístico	21

<b>4.4.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS:</b>	<b>22</b>
<b>4.5 SESGOS, POSIBLES RIESGOS Y DIFICULTADES.</b>	<b>22</b>
<b>4.6. TRAYECTORIA DE LOS INVESTIGADORES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>232</b>
<b>4.7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b>	<b>243</b>
<b>4.8. PRESUPUESTO</b>	<b>254</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>6. DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>	<b>26</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA:</b>	<b>29</b>

### **3. Resumen del proyecto:**

El uso de antibióticos y de dispositivos médicos invasivos contribuye a la aparición de microorganismos resistentes a medicamentos, lo cual dificultan el tratamiento. La neumonía nosocomial, especialmente aquella asociada a ventilación mecánica, es una de las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) más frecuente en la unidad de cuidado intensivo (UCI). Las IAAS están ligadas a la hospitalización principalmente en UCIs, y son causa importante de morbilidad y mortalidad. La microbiota de las vías aéreas en pacientes que requieren ventilación mecánica es un grave problema debido a que colonizan y forman biopelículas rápidamente sobre los tubos orotraqueales, donde persisten y pueden contribuir al deterioro del paciente. Dichas comunidades están compuestas por microorganismos de la flora normal del paciente así como de contaminación cruzada con la microbiota del ambiente hospitalario. Las bacterias más prevalentes se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* entre otros. Previo estudio de los mecanismos de resistencia en estado planctónico y en biopelícula de *K. pneumoniae* a partir de aislados nativos de pacientes colombianos, conscientes de la importancia y la necesidad de generar estrategias de prevención y tratamientos alternativos o nuevos específicamente en las infecciones generadas alrededor de los dispositivos médicos de uso común a nivel hospitalario, en este proyecto se pretende generar conocimiento nuevo y brindar información útil para el desenlace y pronóstico de los pacientes de las comunidades microbianas en biopelícula sobre el tubo orotraqueal en dos UCIs Médico-Quirúrgicas, un tema que si bien ha sido estudiado a nivel mundial, en Colombia sería uno de los pioneros específicamente en el área de biopelículas sobre dispositivos médicos invasivos usados de rutina a nivel hospitalario. En este estudio de corte prospectiva se realizó la caracterización de las comunidades microbianas de las biopelículas formadas sobre el tubo endotraqueal obtenidos por cultivo y por secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA, en los pacientes de 2 unidades de cuidado intensivo en Bogotá- Colombia en el periodo comprendido entre diciembre de 2016 y diciembre de 2017, recolectándose 116 muestras de tubos orotraqueales, Aproximadamente la mitad de las muestras correspondieron a microorganismos pertenecientes al grupo ESKAPE, *K.pneumoniae* fue el microorganismo mas prevalente en las dos unidades de cuidado intensivo en la evaluación de formación de biopelícula y asi mismo es el de mayor capacidad de formación de la misma seguido por *P. aeruginosa*. Se realizó la evaluación de la concentración mínima de erradicación en biopelícula (MBEC) en 4 cepas ( 2 de cada UCI) y en estado planctónico fueron sensibles a carbapenemico sin embargo en estado de biopelícula aumentan su resistencia hasta 8 veces . Los hallazgos aquí presentados generan un base de información sobre la microbiota en

pacientes en UCI que aporta a la comunidad científica y a estudios futuros orientados a generar mejoras en la terapia antibiótica que pueda beneficiar la calidad de vida del paciente y reducir la carga de la enfermedad para el sistema de salud.

#### **4. Descriptores del Proyecto:**

##### **4.1 Planteamiento del problema y Justificación:**

Las infecciones nosocomiales (IN) o IAAS hacen parte de eventos adversos frecuentes ligados a la hospitalización, principalmente en unidades de cuidado intensivo, y se consideran una causa importante de morbilidad y mortalidad [1], [2]. Los agentes etiológicos en las IAAS son bacterias resistentes y multiresistentes a la antibiòticoterapia convencional, en algunos casos resultado del uso indiscriminado de antibiòticos que ejercen presión de selección. Adicionalmente, existen otros factores que contribuyen a las IAAS, como el uso de dispositivos médicos invasivos y de drogas inmunosupresoras, que facilitan el establecimiento de patógenos oportunistas.

La flora bacteriana de la vía aérea es un grave problema en los pacientes ingresados a la UCI y particularmente en los que requieren ventilación mecánica debido a la rápida colonización y formación de biopelículas sobre los tubos orotraqueales (TO) que requieren estos pacientes[3]. Dichas biopelículas son comunidades microbianas complejas y dinámicas, se conocen como estructuras multicelulares, embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos secretados por ellas mismas y adheridas a una superficie biótica o abiótica [4][6]. Las biopelículas se encuentran en la superficie de los dispositivos médicos (catéteres urinarios, tubos orotraqueales, dispositivos intrauterinos, implantes ortopédicos entre muchos otros) y son un mecanismo patogénico para la persistencia microbiana y el deterioro de la respuesta al tratamiento gracias a la resistencia mediada por la biopelícula, a los mecanismos de defensa del hospedero y la terapia antibiòtica.

Este proyecto propone caracterizar la microbiota asociada a la colonización de tubos orotraqueales de pacientes que requieren ventilación mecánica en un hospital de IV nivel de la ciudad de Bogotá, Colombia, con el fin de conocer la prevalencia y la resistencia antimicrobiana de los microorganismos relacionados con las infecciones asociadas al cuidado de la salud en pacientes con ventilación mecánica. Permitiendo conocer el perfil microbiológico de la flora nativa en pacientes colombianos, pudiendo redundar en el tratamiento empírico al cual se deben someter estos pacientes. La información que se adquiera brindará una aproximación útil para el desenlace y pronóstico de los pacientes involucrados.

Como se mencionó previamente, las IAAS son consideradas un problema de salud pública a nivel mundial y son tema crítico en los pacientes intubados (en la UCI) ya que representan una lucha constante y difícil de solventar debido a que complican los tratamientos, limitan las opciones terapéuticas y aumentan los costos asociados a la atención médica. En términos de morbilidad y mortalidad, son importantes en pacientes que requieren prolongación de la estancia hospitalaria, y especialmente en personas inmunocomprometidas y con patologías crónicas. Estimaciones mundiales han reportado que aproximadamente el 10% de los pacientes con hospitalización prolongada adquieren infecciones, de los cuales el 3% muere. A nivel intrahospitalario los microorganismos preferencialmente causantes de este tipo de

infecciones son *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* y bacterias Gram negativas portadoras de genes codificantes de betalactamasas de amplio espectro.

Teniendo en cuenta esto, se estudiarán microorganismos en biopelículas de tubos orotraqueales de pacientes en la UCI, mediante secuenciación masiva de amplicones del 16S. De esta manera se pretende examinar en detalle la variabilidad microbiana e identificar nuevos elementos bacterianos desconocidos que puedan ser determinantes para la progresión y la estabilidad de dichas biopelículas, permitiendo describir el patrón de colonización microbiológica y la resistencia a los antibióticos presente en tubos orotraqueales de esta población de pacientes específica. Esta información será muy valiosa para conocer nuestro propio entorno y plantear medidas de prevención dirigidas a facilitar la escogencia del tratamiento antibiótico empírico.

En Colombia aún no se han desarrollado estudios que permitan conocer la epidemiología local frente a la problemática específica de la colonización de tubos orotraqueales y la presencia de biopelículas en los mismos. Dicha información clínica epidemiológica es de vital trascendencia dado que la flora bacteriana, los antibióticos utilizados de rutina y el comportamiento de las IAAS pueden variar a nivel regional. Por consiguiente, realizar este estudio permitirá: i) plantear alternativas frente a la dificultad en la erradicación de las biopelículas bacterianas; ii) establecer guías de prevención o reducción de la formación de biopelículas; y iii) realizar seguimiento en el progreso de este tipo de infecciones haciendo uso de los antibióticos utilizados en la práctica clínica, según las guías de manejo de una institución en Bogotá, Colombia.

Teniendo en cuenta lo anterior se plantea como pregunta de investigación: ¿Cuáles son las características de las comunidades microbianas de biopelículas formadas sobre tubos orotraqueales de pacientes que requieran ventilación mecánica ingresados a la UCI de la Fundación Santa Fe y Clínica Colombia?

## **4.2 Marco teórico y Estado del Arte:**

### **4.2.1 MARCO CONCEPTUAL**

#### **4.2.1.1 Relevancia clínica de la biopelícula.**

Las biopelículas son estructuras que se desarrollan cuando los microorganismos se adhieren fuertemente a superficies bióticas o abióticas y producen polímeros extracelulares que facilitan la adhesión y forman una matriz que las protege de los ambientes adversos. Estas estructuras pueden estar formadas por una o diversas especies bacterianas y son consideradas como un mecanismo patogénico para la persistencia microbiana debido a que proporcionan resistencia al tratamiento con antibióticos, contribuyendo a que se presenten infecciones crónicas y recalcitrantes a los antibióticos [7], [8]. Su relevancia radica en que se ha postulado que el 99% de todas las células bacterianas existen como biopelícula y tan solo el 1% vive en estado planctónico [9]. La capacidad para formar biopelículas no parece estar restringida a un grupo específico de microorganismos y se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas, y gracias a su versatilidad metabólica, todos los microorganismos

son capaces de formar biopelícula y colonizar diversas superficies bióticas, abióticas, hidrofóbicas o hidrofílicas de prácticamente cualquier ambiente [10].

Al referirnos a biopelículas e infección inmediatamente pensamos en enfermedad. Sin embargo, es importante resaltar que en el humano muchas de las biopelículas formadas pueden aportar beneficios al servir como factor protector. Tal es el caso de las biopelículas de *Lactobacillus* sp., presentes en la vagina, donde fermentan el glucógeno producido por las células epiteliales inducidas por los estrógenos, produciendo ácidos que disminuyen el pH vaginal y previenen de esa manera la colonización por microorganismos patógenos como *Gardnerella vaginalis* y otros microorganismos anaerobios. Otro ejemplo es la microbiota intestinal que se sabe actúa como factor protector en muchos casos a la invasión o crecimiento de patógenos como *Salmonella* sp. y *Shigella* sp., agentes causales de enteritis gastrointestinal [11], [12]. Sin embargo, es evidente que las comunidades microbianas en biopelículas están asociadas con procesos infecciosos y enfermedad. El porcentaje de infecciones bacterianas que involucran formación de biopelículas varía dependiendo de los datos publicados. De acuerdo con el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) y el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos se estima que entre el 65% y el 80% de todas las infecciones involucran biopelículas. Las fuentes de la infección incluyen microbios comensales que viven en la superficie del cuerpo humano, como *Staphylococcus* sp., y microbios ambientales u oportunistas, como *P. aeruginosa*[13].

Las infecciones por biopelículas son diversas y pueden ser crónicas o persistentes. Una infección crónica es aquella que se perpetúa a pesar del tratamiento con antibióticos y que evade también a la respuesta inmune. Estas enfermedades incluyen la placa dental y la caries, infección periodontal, neumonía, cistitis crónica, endocarditis de válvulas nativas, otitis media, prostatitis, osteomielitis, periodontitis, fibrosis quística, endocarditis, infecciones del tracto biliar, osteomielitis, infecciones en heridas y quemaduras, infecciones relacionadas con dispositivos médicos y del tracto urinario, entre otras[14], [15].

Igualmente, las biopelículas se pueden formar en implantes artificiales o dispositivos médicos como válvulas cardíacas, prótesis articulares, catéteres, tubos endotraqueales, marcapasos, dispositivos intrauterinos, entre otros. Aunque no hay datos relacionados con infección para todos los dispositivos médicos, se estima que las tasas de infección son de aproximadamente 2% en prótesis articulares, 1-3% en implantes mamarios, 4% para las válvulas cardíacas mecánicas, marcapasos y desfibriladores, 10% para derivación ventricular, 40% para los dispositivos de asistencia ventricular y 10 – 30% para catéteres urinarios [16], [17]. En este caso los microorganismos pueden proceder de la piel del propio paciente, del personal sanitario o del ambiente. Las biopelículas pueden estar formadas por una única especie o por múltiples especies, dependiendo del implante y de la duración de su uso en el paciente. El desarrollo de una biopelícula en un implante artificial depende de factores como el tiempo de adherencia, el flujo de líquido al que está sometido el implante, el número de bacterias adheridas y las características físico-químicas del implante. En algunos casos las proteínas del plasma y de los tejidos, como fibronectina, fibrinógeno y laminina, entre otras, recubren los dispositivos médicos y favorecen la adherencia bacteriana [17].

Una vez sobre el implante, la biopelícula puede actuar como fuente de infección. Los mecanismos mediante los cuales la biopelícula ocasiona síntomas de la enfermedad aún no

están completamente establecidos, pero se ha sugerido que las bacterias de la biopelícula pueden producir endotoxinas. Las células en biopelículas también pueden resistir mejor la acción de anticuerpos, el ataque de células fagocíticas del sistema inmune y la acción de los antibióticos. Por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias multi-resistentes a la terapia antimicrobiana. Esto se debe en parte a que las células en biopelículas son más difíciles de erradicar que sus contrapartes planctónicas, por lo tanto, estas comunidades representan una fuente potencial para infecciones hospitalarias [17]–[20].

#### 4.2.1.2 Factores que promueven la formación de biopelícula a nivel clínico

Tradicionalmente, en microbiología clínica se identifican tres fases en relación con una enfermedad infecciosa: *contaminación, colonización e infección*. Mientras que la contaminación se refiere a la presencia de bacterias que no necesariamente se multiplican, la colonización indica crecimiento dentro o sobre una superficie o tejido, aunque no necesariamente cause daños o alteración en los tejidos. Finalmente, se refiere a infección cuando las bacterias causan daño tisular y por tanto se observan signos clínicos [17].

Aunque a nivel clínico son muchos los microambientes propicios para el desarrollo de biopelículas, es en el paciente de la UCI donde se presenta un mayor riesgo de infección debido al estado crítico del paciente y su exposición a microorganismos oportunistas, como bacterias y hongos levaduriformes, que pueden ser parte de la microbiota normal del paciente, del ambiente hospitalario o del personal sanitario. Estos patógenos oportunistas pueden colonizar y resultar en una infección sistémica, pero también pueden formar biopelículas sobre dispositivos médicos. Las biopelículas se constituyen, por consiguiente, en una de las principales causas de enfermedades adquiridas a nivel hospitalario puesto que las células son más difíciles de erradicar debido a la alta tolerancia a antimicrobianos y a las defensas del hospedero [21].

Los factores de riesgo para desarrollar una enfermedad infecciosa por biopelículas en el paciente de la UCI, se pueden diferenciar como Factores de riesgo intrínsecos (relacionados con el hospedero) y Factores de riesgo externos (factores de riesgo prevenibles); en general se pueden dividir en cuatro grupos.

1. Relacionados con el hospedero: Estado general del paciente (signos de tensión arterial, glicemia, taquipnea, delirio, ansiedad que dan una idea del grado de severidad de la enfermedad en tratamiento), enfermedades de base como diabetes, SIDA, cáncer (leucemia, linfomas), función del sistema inmune.
2. Relacionados con el dispositivo médico: Características de la superficie de contacto (rugosidad, tipo de material, hidrofobicidad), localización e higiene del catéter que pueda resultar en migración de los microorganismos y colonización, tiempo de colocación.
3. Relacionados con el microorganismo: Velocidad y condiciones de crecimiento (como disponibilidad de nutrientes), capacidad para captar nutrientes y metales, factores de virulencia intrínsecos del microorganismo y capacidad para formar biopelículas y protegerse del medio hostil.
4. Relacionados con el hospital: medidas preventivas para evitar la infección, protocolos de limpieza y esterilización de instrumentos y locaciones.

#### 4.2.1.3 Formación de biopelículas sobre tubo orotraqueal

En pacientes en estado crítico cuya respiración se ve afectada se hace necesaria la ventilación mecánica, que involucra la inserción de un TO conectado a un ventilador. Si bien este procedimiento permite salvar muchas vidas, lleva consigo muchos riesgos. Además de los riesgos e invasividad que por sí misma constituye la implantación del TO, encontramos la acumulación de secreciones en dicho tubo, el debilitamiento de los mecanismos de defensa del paciente y la introducción de bacterias en las vías aéreas estériles (ya sea desde el ambiente o desde las vías respiratorias altas) que favorecen el desarrollo de biopelículas dentro y sobre el TO, por lo tanto la formación de estas estructuras multicelulares sobre dispositivos médicos es frecuentemente observada[20]. Si bien estos motivos aún siguen siendo hipotéticos, sin importar la fuente de contaminación en los TO que den paso a la formación de biopelículas, es seguro que éstas son un importante reservorio para bacterias potencialmente patógenas que pueden propagarse hasta ocasionar infecciones [3], como es el caso de la neumonía asociada a ventilador (NAV), en la cual la posible dispersión de células bacterianas desde la biopelícula hacia los pulmones pueden dar origen a esta enfermedad infecciosa[22].

#### 4.2.1.4 Diversidad microbiana y resistencia a antibióticos de la flora asociada a la biopelícula sobre tubo orotraqueal.

La identificación y cuantificación de los miembros de una comunidad microbiana en particular, así como el entendimiento de las relaciones funcionales entre éstas son factores necesarios para tener un conocimiento más completo sobre los procesos que se pueden dar en esta determinada comunidad, como es el caso de las biopelículas. En este sentido, el desarrollo en las últimas décadas de tecnologías que permiten el estudio de las comunidades microbianas mediante aproximaciones independientes de cultivo ha permitido mejorar el estudio de dichas comunidades [5]. Mediante la aplicación de estas técnicas se ha demostrado que las biopelículas asociadas a TO pueden poseer una alta diversidad, encontrándose presente un alto número de bacterias pertenecientes a la microbiota oral [23], [24]. Además, mediante técnicas tradicionales de cultivo han sido aisladas especies bacterianas de prevalencia las que pertenecen al denominado grupo ESKAPE/ESCAPE, el cual agrupa E: *Enterococcus faecium*, resistente a glicopeptidos, S: *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente, K: *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido, A: *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos, y E: *Enterobacter spp.*, resistente a cefalosporinas de tercera generación. Actualmente, de acuerdo a la actualización de la nomenclatura se incluye C: *Clostridium difficile* y E: que incluye todas las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido y de las cuales algunas son reportadas como posibles agentes causales de NAV [25], [26].

En este sentido, a pesar de que actualmente se cuenta con una variedad de antibióticos para el tratamiento de infecciones como la NAV, diferentes estudios han demostrado que las bacterias en biopelículas pueden ser entre 10 y 1000 veces más resistentes que bacterias planctónicas a antibióticos (ampicilina, estreptomycin, tetraciclinas, gentamicina, etc.) y biocidas oxidantes del tipo del cloro, el yodo o el ozono. También se ha reportado que concentraciones sub-inhedoras de antibióticos, como los aminoglucósidos, pueden inducir

la formación de biopelículas en bacterias como *P. aeruginosa* y *E.coli*[27], [28]. Este comportamiento, que puede ser ventajoso en presencia de antibióticos, tiene implicaciones preocupantes en cuanto al control de patógenos en el ambiente clínico. Además es evidente que las biopelículas bacterianas pueden tener más de un mecanismo de resistencia a los antimicrobianos, y que estos diversos mecanismos pueden actuar de forma simultánea, y en algunos caso sinérgicamente[17].

Esto se puede deber a diversos motivos: i) los cambios fenotípicos en estas bacterias pueden generar resistencias para los organismos que se encuentran dentro de la biopelícula, ii) la inactivación de los antibióticos por polímeros extracelulares o modificaciones enzimáticas o, iii) la limitación de nutrientes puede disminuir la velocidad de crecimiento [5]. Además de la resistencia a antibióticos mediada por la formación de biopelículas en las comunidades bacterianas, existen otros tipos de resistencia que incluyen aspectos como permeabilidad de la célula, bombas de eflujo, modificación enzimática o degradación del antibiótico, adquisición de rutas metabólicas alternativas, modificación del blanco o sobreproducción de una enzima blanco; características que se encuentran más dispersas entre las comunidades bacterianas debido a la transferencia genética y otros mecanismos que pueden dar paso a adquisición de resistencias [29].

#### **4.2.1.5 Microbioma vía aérea**

Microbioma humano es el término utilizado para definir la totalidad de microorganismos y su material genético, que vive dentro del humano o sobre su piel [30]. Por otro lado, la microbiota se define como la totalidad de microorganismos que habitan en un sitio particular del ser humano, generando así diferentes ecosistemas en el cuerpo humano. Estos microorganismos pueden ser bacterias, virus u hongos. Aunque las bacterias han sido las mejor estudiadas y sabemos hoy en día que la microbiota bacteriana excede ampliamente en número a las células del ser humano, no está completamente clarificada su función. Sin embargo y a pesar de los misterios que aun esconde, parte de sus funciones se han ido dilucidando con base en estudios en el sistema gastrointestinal en donde sabemos que juega un papel importante en la maduración del sistema inmune y en la producción de metabolitos secundarios útiles para las células colónicas, por ello, cualquier alteración en su correcto desarrollo o desequilibrio entre las especies presentes puede causar estados mórbidos bien caracterizados en la actualidad[30]. Debido a los avances en esta área, se ha llegado a considerar al ser humano como un "supraorganismo" compuesto por células propias y células microbianas que co-habitan en una relación que en muchos casos puede ser de mutuo beneficio.

La investigación del microbioma de la vía aérea (pulmón) es un campo relativamente nuevo, y puede dar lugar a nuevas formas de pensar sobre la enfermedad respiratoria. Hasta hace muy poco, se creía que los pulmones de los seres humanos sanos eran estériles, pero solo basados en los resultados de los estudios clásicos de cultivo. Este hecho, hizo que los Institutos Nacionales de Salud participantes del proyecto "Microbioma humano" no incluyeran inicialmente el pulmón como un sitio de investigación[31]. Sin embargo, los recientes métodos moleculares independientes de cultivo demuestran que los pulmones de personas sanas e incluso no fumadores están habitadas por comunidades de microorganismos que aunque son muy pocos en número, están compuestas por diversos tipos[32].

Un factor importante en la formación de biopelículas sobre TO es la colonización por parte de las bacterias que se pueden encontrar en las vías respiratorias de cada paciente; se ha propuesto que todo el tracto respiratorio debe ser considerado como un solo ecosistema, extendiéndose desde las cavidades oral y nasal hasta los alveolos, incluyendo así todas las gradientes y nichos que modulan la dispersión, retención, supervivencia y proliferación del microbioma. De esta manera se puede decir que el microbioma del tracto respiratorio está determinado por tres factores: migración, eliminación y crecimiento de todos los miembros que hacen parte de este [34] y que pueden ser definitivos durante el proceso de formación de biopelículas sobre dispositivos como TO o al desarrollo de infecciones [35]. Comprender el microbioma que coloniza los TO es un paso esencial para conocer cuál es el foco u origen infeccioso de algunas patologías, incluyendo la fibrosis quística, enfermedad respiratoria del recién nacido, las exacerbaciones de EPOC y el asma, e incluso podrán ser consideradas valiosas en caso de trasplante de pulmón [36].

#### **4.2.1.6 Neumonía asociada a ventilación**

El diagnóstico temprano y preciso de la Neumonía Asociada a Ventilador (NAV) puede ser difícil. La constelación de síntomas y signos que se emplean comúnmente para diagnosticar la neumonía (fiebre, leucocitosis, infiltrado nuevo en la radiografía de tórax y tos productiva con cultivo de esputo en que se demuestra crecimiento predominante de un solo microorganismo) no son fácilmente identificables en el paciente de la UCI sometido a ventilación mecánica. La fiebre y la leucocitosis son inespecíficas, los infiltrados en la radiografía de tórax pueden deberse a edema pulmonar, lesión inducida por el ventilador, etc., y el cultivo de esputo casi siempre es positivo a causa de la colonización no patogénica del árbol traqueobronquial, la cual puede aparecer ya en el quinto día de la terapia con ventilación mecánica [37]–[40]. A fin de impedir la demora en la terapia, en muchas UCI se inicia la administración de antimicrobianos de amplio espectro cuando hay sospecha de neumonía asociada al ventilador, terapia que continúa durante un tiempo prolongado sin que llegue a establecerse si el paciente tuvo neumonía asociada al ventilador. Esto implica un uso excesivo de los antimicrobianos de amplio espectro, lo que ocasiona resistencias bacterianas y daño al paciente. Una práctica cuyo uso viene en aumento con el propósito de alcanzar un equilibrio entre estas necesidades opuestas (la de suministrar al paciente una terapia temprana y adecuada, limitando al mismo tiempo el empleo de antimicrobianos de amplio espectro) es el uso de cultivos cuantitativos del árbol respiratorio bajo [37]. Después de tomar la muestra para el cultivo, se inicia la terapia empírica con antimicrobianos de amplio espectro, y en cuanto se dispone de los resultados del cultivo cuantitativo del árbol respiratorio bajo se pueden reducir los antimicrobianos [39], [40].

#### **4.2.2 ESTADO DEL ARTE**

##### **4.2.2.1 Análisis situacional de la infección nosocomial y neumonía asociada a ventilador**

La neumonía asociada al ventilador y la neumonía nosocomial, son definidas como las infecciones pulmonares adquiridas durante la ventilación mecánica y durante la

hospitalización, respectivamente, son entidades comunes en las unidades de cuidado intensivo, están asociadas a alta morbilidad y complican la evolución del 8%- 28% de los pacientes que reciben ventilación mecánica [41], [42]. La incidencia de neumonía es considerablemente más alta en las unidades de cuidado intensivo (UCI) que en los otros servicios hospitalarios y el riesgo es tres a diez veces mayor en los pacientes con intubación orotraqueal[43], [44]. A diferencia de otras infecciones asociadas al cuidado de la salud, cuya mortalidad oscila entre 4% y 7%, la mortalidad por neumonía adquirida en las 48 horas posteriores a la intubación orotraqueal, asciende a una mortalidad atribuible de 27,1%, con un RR (riesgo relativo) de 5,0 [41].

Diferentes estudios han demostrado que el diagnóstico precoz y el tratamiento antimicrobiano adecuado mejoran los desenlaces clínicos, en especial la mortalidad [45]. El panorama es aún más preocupante, al considerar que algunos trabajos recientes vinculan la presencia de neumonía asociada al ventilador no sólo con aumento en la mortalidad sino también con la prolongación de la estancia de los pacientes, tanto en la UCI como en el hospital, así como con el incremento de los costos totales de la atención (alrededor de 40.000 dólares por episodio infeccioso en los Estados Unidos) [46].

La ausencia de un “patrón de oro” para el diagnóstico de neumonía asociada al ventilador permanece como la gran limitante en la universalización de la definición, por lo que los datos de incidencia, prevalencia y mortalidad exhiben una gran variabilidad. Por definición, esta entidad corresponde a una inflamación del parénquima pulmonar causada por agentes infecciosos no presentes previamente o que están apenas incubándose en el momento de iniciarse la ventilación mecánica; sin embargo, cuando se analizan estudios que incluyen información histopatológica es usual que aun en presencia de inflamación evidente del parénquima pulmonar los estudios microbiológicos sean negativos; tal circunstancia no ha permitido, hasta la fecha, establecer un consenso universal sobre los criterios diagnósticos [47].

La neumonía nosocomial ocurre 48 horas o más después de la admisión hospitalaria y no estaba en el momento de la admisión, y hasta 72 horas después de la salida hospitalaria. La neumonía asociada al ventilador se refiere a la neumonía que ocurre 48 horas después de la intubación orotraqueal. La neumonía asociada a los cuidados de la salud (NACS) incluye los pacientes que han estado hospitalizados por más de dos días dentro de los 90 días previos; pacientes que residen en hogar para crónicos; aquellos que han recibido nutrición parenteral, anti- bióticos, quimioterapia o curación de heridas en los 30 días previos a la neumonía; o quienes han recibido tratamiento dialítico en una institución de salud.

Es conveniente diferenciar entre la neumonía asociada al ventilador temprana, es decir, aquella que tiene lugar durante los primeros cuatro días después de iniciada la ventilación mecánica, y la tardía que se presenta después del cuarto día, pues existen diferencias importantes entre una y otra en términos de agentes causales, severidad y pronóstico [48]. Diferentes estudios muestran incidencias variables de esta entidad, que oscilan entre 9% y 64%, según el método diagnóstico utilizado, y la mortalidad asociada es alrededor de 25%. La intubación orotraqueal prolongada (definida como mayor a 48 horas) es el principal factor de riesgo para su desarrollo en los pacientes hospitalizados en las UCI, pues la incidencia de neumonía es tres veces superior entre los individuos intubados, respecto a aquellos tratados

con ventilación no invasiva [47], [49], [50].

Cook y colaboradores [41] establecieron, en un gran estudio prospectivo de 1.014 pacientes ventilados, que si bien el riesgo acumulado de desarrollar neumonía asociada al ventilador aumenta con el tiempo, el riesgo diario disminuye después de cinco días, pues en esta investigación, el riesgo por día fue de 3% al día cinco, de 2% para el día 10 y de 1% al día 15, en tanto que los predictores independientes de desarrollo de esta complicación fueron: ingreso a la UCI por quemaduras o trauma, presencia de enfermedades respiratorias, cardíacas o del sistema nervioso central, ventilación mecánica durante las 24 horas previas, broncoaspiración y uso de agentes paralizantes. De manera inesperada, los investigadores encontraron que la exposición previa a un antibiótico podría ser un factor protector inicial (RR 0,4; IC 95% 0,3-0,5) aunque dicha protección no se mantenía en el tiempo.

En relación con la mortalidad atribuible a neumonía asociada al ventilador, los porcentajes en las diferentes publicaciones son muy variables de acuerdo con el tipo de población, el método diagnóstico empleado y las condiciones patológicas asociadas, pero en términos generales, dicha complicación incrementa entre dos y diez veces la probabilidad de un desenlace fatal. Ello evidencia, entre otras cosas, la gran dificultad estadística para establecer la mortalidad atribuible a esta infección [48]–[51].

Otros resultados de estudios de cohortes, que evalúan mortalidad y riesgo atribuible reportan una mortalidad por neumonía asociada al ventilador superior a 25%, con un riesgo relativo de muerte de 5,0, cifras que aumentan, respectivamente, a 40% y 7,0, cuando las bacterias aisladas son *Pseudomonas* o *Acinetobacter*[52], [53]. Algunas condiciones vinculadas al aumento en el riesgo de muerte son [54]:

- . Empeoramiento de la falla respiratoria existente.
- . Presencia de una condición rápidamente fatal.
- . Choque de cualquier origen.
- . Inicio de terapia antibiótica inadecuada.
- . Paciente tratado en UCI médica.

#### **4.2.2.2 Flora asociada a TO, microorganismos prevalentes y reportados.**

La información generada en el ámbito nacional sobre la etiología y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, provienen en su mayoría de redes que incluyen hospitales de tercer nivel de las principales ciudades del país (CIDEIM, RENOVA, GREBO, GERMEN) y en los últimos años de subsistemas de vigilancia de salud pública como el de la Secretaría Distrital de Salud y el Sistema Nacional de Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud y resistencia bacteriana [55], [56]. Si bien esta información consolidada ha permitido conocer el comportamiento general de organismos de origen hospitalario, la información específica sobre etiología y resistencia, según las principales patologías asociadas a la atención en salud, como en el caso de neumonía nosocomial, es más limitada. Por otro lado, la dificultad en la interpretación de los resultados microbiológicos radica en la representatividad de las muestras que aseguren que los microorganismos corresponden a procesos infecciosos y no a colonización.

Los resultados de estudios de vigilancia de neumonía asociada a ventilación mecánica del Consorcio Internacional de Infección Hospitalaria (INICC) en 10 unidades de cuidado intensivo de Colombia entre 2002 y 2005, mostraron que 46% de los casos eran causados por enterobacterias, 29% por *S. aureus*, 22% por *P. aeruginosa* y 3% por *A. baumannii*[57].

Los datos de vigilancia de corte prospectiva de los años 2007 a 2009 en 39 unidades de cuidado intensivo de la red GRUVECO, permitieron establecer el diagnóstico etiológico en 435(n=804)casos. *P.aeruginosa* ocupó el primer lugar (24%) seguido de *K. pneumoniae*(23%), *S. aureus*(11%), *E. coli*(5%), *A. baumannii*(4%) y *Stenotrophomonas maltophilia* (4%) [58].

La información generada por el subsistema de vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud de Bogotá, indica para el año 2010 que los cuatro principales agentes marcadores de resistencia en neumonía asociada a ventilación mecánica en las 55 unidades notificadoras del tercer nivel correspondieron a *P. aeruginosa* (29% resistencia a carbapenémicos) *K. pneumoniae* (32% resistente a cefalosporinas de tercera generación y 10% de resistencia a carbapenémicos), *S. aureus* (10% resistencia a meticilina) y *E. coli*(10% resistente a cefalosporinas de tercera generación) . Datos globales del mismo sistema de vigilancia y que coincide con lo informado a nivel global, confirman entre 70% a 80% de multiresistencia en *A. Baumannii* [59].

La neumonía nosocomial es la segunda causa de infección nosocomial y la primera causa de mortalidad atribuible con un valor de 30% [60], [61]. Representa 5 a 10 casos por cada 1.000 ingresos hospitalarios [60]–[64]. La neumonía asociada a ventilación mecánica es una forma seria de neumonía nosocomial con una mortalidad cruda de 24% a 76% con un incremento entre 1 a 10 veces en el riesgo de muerte comparado con pacientes sin neumonía. La neumonía asociada al ventilador aumenta la estancia en UCI y la duración de la ventilación mecánica y el tiempo total de hospitalización [46], [65].

Los costos atribuibles a la neumonía nosocomial se derivan de una lista que incluye los exámenes adicionales para su diagnóstico y seguimiento, el manejo antibiótico, el uso de recursos técnicos y humanos adicionales, así como la estancia prolongada en ventilación mecánica, en la UCI y en el hospital [66]. Claramente esto varía considerablemente de un país a otro y de la metodología que se sigue para obtener los costos de cada una de las variables incluidas [66]–[70].

En Colombia un estudio [71] realizado en 90 pacientes, encontró que el costo total de los pacientes sin neumonía asociada al ventilador fue de U\$ 7.950 vs. U\$ 21.217 de los pacientes con neumonía asociada al ventilador ( $p < 0,001$ ). El costo incremental fue de U\$ 14.328 y en el análisis multivariado la neumonía asociada al ventilador se asoció significativamente con los costos totales [71].

### **4.3 Objetivos:**

#### **4.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar las comunidades microbianas de biopelículas formadas sobre tubos orotraqueales de pacientes que requieran ventilación mecánica ingresados a la UCI de la Fundación Santa Fe y Clínica Colombia.

#### **4.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar la microbiota bacteriana y la susceptibilidad antimicrobiana presente en la biopelícula formada sobre el TO mediante cultivos microbianos.
2. Describir de la microbiota bacteriana independiente de cultivo, asociada a tubo orotraqueal mediante metagenómica.
3. Evaluar las características epidemiológicas de los pacientes con intubación orotraqueal entre 2 a 21 días.
4. Calcular la incidencia de neumonía asociada a ventilación mecánica en la población estudiada y su correlación con los microorganismos aislados.

### **4.4 Metodología:**

**4.4.1 Diseño del estudio:** Estudio de tipo descriptivo de corte prospectiva.

#### **4.4.2 Población de estudio, Criterios de inclusión y exclusión:**

La población objetivo, serán los pacientes atendidos en la la fundación San Fe de Bogotá (FSFB) y la Clínica Colombia, que requieran ventilación mecánica por un periodo de 2 a 21 días. Igualmente, de encontrar resultados importantes quizá también es posible extrapolar a otras clínicas que tengan Unidad de Cuidado intensivo.

La población de estudio serán pacientes atendidos en la FSFB y Clínica Colombia que requieran intubación con sonda oro-traqueal por un periodo de 2 a 21 días, durante 1 año es decir el 2016 y 2017.

#### **Inclusión:**

- Pacientes en la unidad de cuidado intensivo de la FSFB y clínica Colombia con intubación orotraqueal entre 2 y 21 días

#### **Exclusión:**

- Ventilación mecánica mayor a 21 días, y menor a 2 días
- No se recolectaran cánulas de traqueostomía
- Muestras contaminadas por cualquier razón como caída del tubo

#### 4.4.3 Muestra:

El tipo de muestreo es no probabilístico y se hace por conveniencia basado en los estudios mencionados previamente en el marco teórico.

La muestra serán los tubos orotraqueales de pacientes adultos de género masculino y femenino, que requieran ventilación mecánica en un rango de 2 a 21 días de intubación, en la UCI médica en la FSFB. Serán excluidos del estudio los tubos orotraqueales que por algún motivo sean mal manipulados a la hora de la toma de la muestra, o que no se inicie su procesamiento en los tiempos adecuados y que puedan generar falsos positivos o negativos. Dichas muestras serán recolectadas por un período de 12 meses establecido a partir del inicio del proyecto, este muestreo será por conveniencia consecutivo recolectando todos los tubos con un estimado de 12 a 15 pacientes por mes.

Los análisis microbiológicos se realizarán a todos los tubos orotraqueales recolectados, y la información clínica será obtenida a partir de la historia clínica de los pacientes. Los investigadores de este estudio no realizarán ningún contacto o intervención directamente con el paciente.

#### 4.4.4 Variables de estudio

Nombre de la variable	Definición operativa	Escala de medición	Valores
Sexo	Femenino y masculino	Cualitativa	1. Femenino 0. Masculino
Edad	Años cumplidos del paciente	Cuantitativa	Mayores de 18 años
Condición de inmunosupresión	Paciente con enfermedad inmunosupresora	Cualitativa	0.No 1.Sí
VIH	Paciente con VIH	Cualitativa	0.No 1.Sí
Antecedente oncológico	Paciente con antecedente oncológico	Cualitativa	0.No 1.Sí
Trasplante	Paciente con trasplante de algún órgano	Cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de esteroides	Paciente con registro de uso de esteroides	Cualitativa	0.No 1.Sí
Otras causas de inmunosupresión	Posee alguna enfermedad inmunosupresora diferente a las anteriormente mencionadas	Cualitativa	Abierto
Motivo de ingreso a UCI	Enfermedad que hizo necesario el ingreso a la UCI	Cualitativa	CIE 10
Motivo de intubación OT	Enfermedad que hizo necesaria la intubación	cualitativa	CIE 10
Episodio previo de SOT	Si el paciente requirió previamente SOT	cualitativa	0.No 1.Sí

Distancia a la que se fijó el tubo	Marca visible del tubo al momento de ser intubado el paciente	cuantitativa	Cms
Uso de antibiótico previo a la entrada hospitalaria	Uso de antibióticos en los días previos a la hospitalización	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de macrolido previo a la entrada hospitalaria	Uso de macrolidos en los días previos a la hospitalización	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de aminoglucósidos previo a la entrada hospitalaria	Uso de aminoglucósidos en los días previos a la hospitalización	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de betalactámicos previo a la entrada hospitalaria	Uso de betalactámicos en los días previos a la hospitalización	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de quinolonas previo a la entrada hospitalaria	Uso de quinolonas en los días previos a la hospitalización	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de glicopéptidos previo a la entrada hospitalaria	Uso de glicopéptidos en los días previos a la hospitalización	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de antibiótico previo a la entrada a UCI	Uso de antibióticos en los días previos a la entrada a UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de macrolido previo a la entrada a UCI	Uso de macrolidos en los días previos a la entrada a UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de aminoglucósidos previo a la entrada a UCI	Uso de aminoglucósidos en los días previos a la entrada a UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de betalactámicos	Uso de betalactámicos en los días previos a la entrada a UCI	cualitativa	0.No 1.Sí

previo a la entrada a UCI			
Uso de quinolonas previo a la entrada a UCI	Uso de quinolonas en los días previos a la entrada a UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de glicopéptidos previo a la entrada a UCI	Uso de glicopéptidos en los días previos a la entrada a UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de antibiótico durante el tiempo de intubación en UCI	Uso de antibióticos en los días que permaneció intubado en la UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de macrolido durante el tiempo de intubación en UCI	Uso de macrolidos en los que permaneció intubado en la UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de aminoglucósidos durante el tiempo de intubación en UCI	Uso de aminoglucósidos en los días que permaneció intubado en la UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de betalactámicos durante el tiempo de intubación en UCI	Uso de betalactámicos en los días que permaneció intubado en la UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de quinolonas durante el tiempo de intubación en UCI	Uso de quinolonas en los días que permaneció intubado en la UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Uso de glicopéptidos durante el tiempo de intubación en UCI	Uso de glicopéptidos en los días que permaneció intubado en la UCI	cualitativa	0.No 1.Sí

Días de intubación	Número de días durante los cuales el paciente requirió intubación orotraqueal	cuantitativa	2 a 21 días
Diagnóstico de neumonía en la UCI	Fue diagnosticado el paciente con neumonía durante la estancia en la UCI	cualitativa	0.No 1.Sí
Carga microbiana en el tubo orotraqueal	Cantidad de microorganismos identificados en el tubo orotraqueal	cuantitativo	Abierto
Presencia de microorganismo grupo ESKAPE	Identificación del microorganismo del grupo ESKAPE	cualitativa	0.No 1.Sí
Presencia de Enterobacterias	Presencia de Enterobacterias en el tubo orotraqueal	cualitativa	0.No 1.Sí
Tipo de enterobacteria	Tipo de Enterobacterias identificada en el tubo orotraqueal	cualitativa	Abierta
Identificación de la enterobacteria	Técnica mediante la cual se realizó la investigación	cualitativo	0. Cultivo 1. Metagenómica 2. Ambos
Presencia de <i>Enterococcus faecium</i>	Presencia de <i>Enterococcus faecium</i> en el tubo orotraqueal	cualitativa	0.No 1.Sí
Identificación de <i>Enterococcus faecium</i>	Técnica mediante la cual se realizó la investigación	cualitativo	0. Cultivo 1. Metagenómica 2. Ambos
Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en el tubo orotraqueal	cualitativa	0.No 1.Sí
Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	Técnica mediante la cual se realizó la investigación	cualitativo	0. Cultivo 1. Metagenómica 2. Ambos
Presencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Presencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en el tubo orotraqueal	cualitativa	0.No 1.Sí
Identificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Técnica mediante la cual se realizó la investigación	cualitativo	0. Cultivo 1. Metagenómica 2. Ambos
Presencia de <i>Acinetobacter baumannii</i>	Presencia de <i>Acinetobacter baumannii</i> en el tubo orotraqueal	cualitativa	0.No 1.Sí
Identificación de <i>Acinetobacter baumannii</i>	Técnica mediante la cual se realizó la investigación	cualitativo	0. Cultivo 1. Metagenómica 2. Ambos
Presencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Presencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el tubo orotraqueal	cualitativa	0.No 1.Sí

Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Técnica mediante la cual se realizó la investigación	cualitativo	0. Cultivo 1. Metagenómica 2. Ambos
Presencia de <i>Enterobacter</i> spp.	Presencia de <i>Enterobacter</i> spp. en el tubo orotraqueal	cualitativa	0.No 1.Sí
Identificación de <i>Enterobacter</i> spp.	Técnica mediante la cual se realizó la investigación	cualitativo	0. Cultivo 1. Metagenómica 2. Ambos
Otro tipo de microorganismo por cultivo	Presencia de otros tipos de microorganismos en el tubo orotraqueal diferentes al grupo ESKAPE identificado por cultivo	cualitativa	Abierta
Otro tipo de microorganismo por metagenómica	Presencia de otros tipos de microorganismos en el tubo orotraqueal diferentes al grupo ESKAPE identificado por metagenómica	cualitativa	Abierta
Formación de biopelículas	Capacidad del microorganismo de formar biopelículas	cualitativo	0. No 1.Sí
Resistencia antimicrobiana	Capacidad del microorganismo a resistir el tratamiento con determinado antibiótico	cualitativo	0. No 1.Sí
Enterobacteria con resistencia	Enterobacteria que presente resistencia a por lo menos 3 grupos de antibióticos	cualitativo	0. No 1.Sí
<i>Enterococcus faecium</i> con resistencia	<i>Enterococcus faecium</i> que presente resistencia a por lo menos 3 grupos de antibióticos	cualitativo	0. No 1.Sí
<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia	<i>Staphylococcus aureus</i> que presente resistencia a por lo menos 3 grupos de antibióticos	cualitativo	0. No 1.Sí
<i>Klebsiella pneumoniae</i> con resistencia	<i>Klebsiella pneumoniae</i> que presente resistencia a por lo menos 3 grupos de antibióticos	cualitativo	0. No 1.Sí
<i>Acinetobacter baumannii</i> con resistencia	<i>Acinetobacter baumannii</i> que presente resistencia a por lo menos 3 grupos de antibióticos	cualitativo	0. No 1.Sí
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> con resistencia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> que presente resistencia a por lo menos 3 grupos de antibióticos	cualitativo	0. No 1.Sí
<i>Enterobacter</i> spp. con resistencia	<i>Enterobacter</i> spp. que presente resistencia a por lo menos 3 grupos de antibióticos	cualitativo	0. No 1.Sí

#### **4.4.5. Procedimientos experimentales**

##### **4.4.5.1 Toma y almacenaje de la muestra**

La toma de la muestra (tubo orotraqueal) se realizará previo consentimiento informado del paciente o persona encargada y se enviará al laboratorio de microbiología. El tubo orotraqueal obtenido luego de la extubación del paciente será empacado en Frascos Schott, con solución salina para el transporte al laboratorio. La muestra se almacenará en una nevera de poliestireno, destinada únicamente para tal fin y se procesará dentro de las dos horas siguientes a su recolección. El tubo orotraqueal será suspendido en solución salina y se someterá a vortex para desprender las células adheridas. Esta solución será utilizada para la extracción de DNA y el cultivo de los microorganismos viables.

##### **4.4.5.2 Obtención de aislamientos bacterianos**

Una parte de la suspensión bacteriana obtenida del tubo orotraqueal será utilizada para recuperar las cepas por cultivo tradicional, por lo que serán sembradas en medios tradicionales como Agar sangre, Agar MacConkey, Agar chocolate y tioglicolato, así como también medios específicos para anaerobios. Las cepas se recuperaran a 37°C durante un periodo de incubación de entre 24-48h. Los microorganismos aislados serán sometidos a identificación y sensibilidad antimicrobiana utilizando un sistema automatizado como Vitek o MicroScan. En todos los casos, las cepas se conservaran en caldo LB con glicerol al 20% a -80°C.

##### **4.4.5.3 Extracción de ADN, librerías y secuenciación.**

La extracción de DNA total, se realizara a partir de la suspensión recolectada inicialmente y se llevará a cabo utilizando protocolos que se han realizado en proyectos previos de microbioma humano en CorpoGen. La extracción se realizará utilizando el kit de extracción de DNA MoBioPowerSoil (MOBioLaboratories, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el análisis de las comunidades bacterianas se estudiará la región hipervariable V3 y V4 del gen del 16S rRNA, con la plataforma MiSeq en una configuración 2x300.

El DNA extraído previamente se amplificará mediante PCR haciendo el uso del iniciador 341F (5'CCTACGGGNGGCWGCAG 3') y 805R (5' GACTACHVGGGTATCTAATCC3'). Todas las muestras se secuenciaran haciendo uso de "barcodes" o etiquetas para cada muestra y una estrategia Paired End de 300 pb (PE<sub>300</sub>).

Como alternativa se podría utilizar la Tecnología MinION (Oxford Nanopore Technologies), la cuál permite la secuenciación de amplicones enteros de la molécula 16S para hacer estudios a nivel de especie y cepas presentes en dichas comunidades.

#### **4.4.5.4 Análisis de secuencias - perfil taxonómico de la comunidad (16SrRNA)**

El primer conjunto de análisis se denominan análisis de alfa diversidad, con los cuales se estudiará cada uno de los individuos para conocer cuántos especies teóricas o linajes existen y así mismo, poder determinar y describir la diversidad y riqueza presente. El segundo componente estará dado por los análisis para la determinación de la diversidad beta, en donde se comparará la diversidad presente en los diferentes grupos de individuos, identificando los taxa o linajes que se comparten entre muestras y entre las distintas condiciones del individuo (“the core microbiome”) así como la determinación de una posible comunidad dada una condición.

El procesamiento de las secuencias generadas se realizará utilizando principalmente el software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), el cual es ampliamente utilizado en análisis de comunidades microbianas procariotas y eucariotas[72]. En CorpoGen actualmente se tiene desarrollado un flujo de trabajo semi-automatizado, el cual incorpora todas las herramientas necesarias para el análisis exhaustivo de las comunidades microbianas. Este flujo de trabajo comprende inicialmente la limpieza de las secuencias por parámetros de calidad y tamaño, además de una separación por etiquetas o "barcodes" de cada una de las muestras incluidas en la secuenciación masiva. Así mismo, la depuración de quimeras también se realizara para obtener finalmente “datasets” confiables para los subsecuentes análisis de diversidad alfa y beta.

#### **4.4.5.5 Análisis de formación de biopelículas y determinación de MBEC**

De los aislamientos obtenidos se seleccionará un grupo representativo de microorganismos (preferiblemente del grupo ESCAPE) los cuales serán analizados para formación de biopelícula y determinación de MBEC.

##### **4.4.5.5.1 Determinación de biopelícula: Cultivo estático**

La determinación de biopelícula se realizará siguiendo protocolos previamente reportados[73]–[75], los cuales se realizarán en medio de cultivo Luria Bertani (LB). Brevemente, se parte de un cultivo O/N en el medio a 37°C, crecido con agitación a 200 rpm, por triplicado. El cultivo líquido se diluye 1/100 en medio fresco, se coloca en una placa de microtitulado de poliestireno (MICROTEST™ 96, BD Falcon, San Jose CA), y se incuba a 37°C durante 18 h. Trascurrido este tiempo se determina crecimiento bacteriano por espectrofotometría (TECAN Suiza) a una longitud de onda de 595nm, se descartan las células planctónicas, se hacen tres lavados con agua estéril y las células bacterianas adheridas se tiñen con cristal violeta al 0,1% durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se retira el colorante, se lava nuevamente con agua estéril, se eluye la biopelícula con SDS al 10% y se cuantifica por absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (TECAN Suiza). Todos los ensayos se realizan por lo menos con tres réplicas biológicas y al menos con 4 réplicas técnicas. Como se trata de estandarizar inicialmente el protocolo, también se emplearan diferentes superficie, por lo que se utilizan placas de policloruro de vinilo (PVC), (BD Falcon 96-Well PVC Plates, 353911, San Jose CA) o de poliestireno (Cell Culture plates 96 WellCorning®Costar®, USA).

#### 4.4.5.2 Determinación de la concentración mínima bactericida en biopelículas (MBC<sub>B</sub>)

Una vez se tenga el banco de las cepas recolectadas previamente y luego del análisis de biopelículas se seleccionará un grupo de microorganismos específico, sobre el cual se determinaran las MBCs. Estas se harán inicialmente con antibióticos de uso común en la clínica contra los patógenos en estudio, tales como: AMK, IMP, CIP y TS, formando primero la biopelícula en placas con estacas o pines de poliestireno (CBD o Calgary BiofilmDevice, Thermo NUNC), siguiendo protocolos reportados (Harrison JJ, et al 2010). Se tomaran 100 µL de un cultivo O/N a 37°C para inocular en 3 mL de medio MH, y se deja crecer hasta alcanzar la escala 0,5 de McFarland (45 min aprox). A partir de este cultivo se realiza una dilución 1/100, y se siembran 150 µL en pozos de una placa de microtitulación de 96 pozos con tapa de pines (Thermo NUNC), se incubará durante 24 h a 37°C hasta obtener una biopelícula madura sobre las estacas. Transcurrido este tiempo se remueve la tapa donde están formadas las biopelículas y se colocan dentro de una nueva placa de 96 pozos con 150 µL de medio MH suplementado con las concentraciones de antibiótico correspondiente a la MIC, y concentraciones superiores. Se deja nuevamente O/N (18h) a 37°C y al día siguiente, se determina la concentración mínima de antibiótico que evita crecimiento microbiano visible, lo cual se define como MBEC o “minimum biofilm eradication concentration” por sus siglas en inglés. La concentración mínima de antibiótico que reduce la viabilidad en 3.0 unidades log (mata el 99.9% de la población original) con respecto al control de crecimiento sin antibiótico se define como la MBC<sub>B</sub> (concentración mínima bactericida en biopelícula) [76], [77].

#### 4.4.6 Ensayos análisis de resistencia bacteriana

Como trabajo complementario se buscaran métodos exploratorios que permitan conocer y describir la resistencia bacteriana en la población estudio. En este sentido, se podría hacer Tipificación multilocus de secuencias (MLST) para el estudio de la variabilidad genotípica de los aislamientos permitiendo identificar circulación de cepas con resistencias específicas. Adicionalmente, se puede buscar la identificación de elementos móviles o integrones de los aislamientos que muestren resistencia a los antibióticos evaluados.

#### 4.4.7 Análisis estadístico

Se obtuvieron 116 muestras de tubos orotraqueales provenientes de pacientes en dos UCI de Bogotá, se realizó cultivo de gérmenes comunes. Se realizó la evaluación de formación de biopelícula en los microorganismos provenientes del grupo ESKAPE (Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, y otras enterobacterias), para los cuales también se analizaron los perfiles de resistencia obtenidos por antibiograma. Además, se determinó la concentración mínima de erradicación en biopelícula (MBEC) en 4 cepas de K. pneumoniae susceptibles a meropenem de las dos UCI. Se analizó la microbiota mediante secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA y los resultados obtenidos fueron analizados paralelamente por los flujos de trabajo de Mothur y QUIIME II.

La descripción de la población por cada una de las características recolectadas se realizó mediante medidas de tendencia central cálculos de frecuencias absolutas y relativas. Los perfiles de resistencia se compararon a través de porcentajes (Porcentaje de sensibles vs porcentaje de resistentes).

Se realizaron pruebas de normalidad ( $p < 0,05$ ) que indicaban una distribución anormal de los datos (OTUs obtenidas), por lo que para el análisis de los índices de diversidad (índice de Simpson) se realizó por el test estadístico de U de Mann Whitney con variables consideradas clínicamente importantes (Diagnóstico de NAV y período de intubación).

La frecuencia de los taxones phylum y familia fue descrito a través de porcentajes de cada uno de los OTUs para la variable Neumonía asociada a ventilación

#### **4.4.8 Consideraciones Éticas:**

El proyecto contempla la recolección de tubos orotraqueales de pacientes internados en la Unidad de Cuidado Intensivo, a los pacientes no se les realizará ningún procedimiento adicional, ya que las muestras analizadas corresponden al tubo orotraqueal posterior a la extubación. No hay riesgos asociados a venopunción u otros procedimientos.

Los principios generales que emmarcan el proyecto se basan en la Resolución 8430 por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, de acuerdo con esto, en el artículo 11, el proyecto se clasifica en la categoría B, Investigación con riesgo mínimo. Igualmente, nos acogemos a la declaración de Helsinki, que regula a nivel internacional la Investigación Biomédica en Humanos. De manera que todos los resultados serán publicados y divulgados manteniendo la confidencialidad (No hay información del paciente y se guardará la confidencialidad de la historia clínica).

La Corporación CorpoGen ha realizado estudios similares y cuenta con normas de bioseguridad y reglamentos para la manipulación y desecho de materiales biológicos que garantizan la preservación del ambiente y la salud de los trabajadores (Resolución 1164 del 2002 del Ministerio de Medio Ambiente). El transporte de las muestras se llevará a cabo en recipientes cerrados, marcados como peligro riesgo biológico, y el personal que lo transporte estará entrenado en el manejo de estas muestras. Todos los experimentos serán realizados in vitro sin el empleo de animales de laboratorio.

#### **4.5 Sesgos, posibles riesgos y dificultades.**

Dentro de las posibles dificultades previstas en el desarrollo del proyecto, puede ser la muestra, se tiene un estimado de pacientes con el que se espera captar entre 180 a 200 tubos, lo cual un riesgo es que no se obtengan suficientes muestras en el tiempo estimado de recolección, para lo cual se deberán tomar unos meses más de muestreo.

Otra dificultad podría ser en el momento de obtener ADN, aunque gracias a las tecnologías modernas se necesita muy poca cantidad de ADN.

Para evitar sesgos en la obtención de resultados los equipos están calibrados y estandarizados para obtener una información de alta calidad.

Por otro lado, las personas que recolectaran la información requerida de la historia clínica serán entrenadas para recopilar la información de forma adecuada, teniendo controles de calidad periódicos, asegurando que la información recolectada es veraz.

Uno de los principales sesgos del estudio es el de selección por pérdidas de las muestras, el cual se controló mediante un riguroso protocolo de almacenamiento y traslado a microbiología por llamado inmediato durante el proceso de extubación de los pacientes para recolección y traslado de la muestra

No hay sesgos de confusión al no haber análisis multivariado

#### **4.6. Trayectoria de los investigadores que participan en el proyecto de investigación:**

##### **- Genética Molecular - CorpoGen**

El grupo de Genética Molecular pertenece a la Corporación CorpoGen, el cual es un centro de investigación sin ánimo de lucro fundado en 1995 por científicos colombianos con el fin de impulsar el desarrollo de la ciencia y la tecnología, básica y aplicada, enfocada hacia la solución de problemas a nivel nacional. El grupo está reconocido por Colciencias, categoría A1, y ha trabajado desde hace varios años en el tema de microorganismos patógenos, y en proyectos sobre microbiota humana y ambiental. Algunos de estos proyectos incluyen la caracterización molecular de micobacterias y trabajos orientados a entender los mecanismos moleculares de latencia de *M. tuberculosis*. Más recientemente se realizó un estudio de la microbiota asociada a pacientes con tuberculosis. En el área de la Microbiología Ambiental se han analizado comunidades de microorganismos en diferentes ambientes, como parte del Centro de Excelencia en Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos, Gebix, que fue dirigido y coordinado por la Dra. Ma. Mercedes Zambrano y cuyo objeto fue desarrollar herramientas y realizar estudios en metagenómica y bioprospección microbiana. Varios de estos trabajos se han realizado en colaboración con diferentes grupos de investigación a nivel nacional e internacional. En el momento, el grupo termina un proyecto sobre resistencia y persistencia del patógeno oportunista *K. pneumoniae* y está en proceso de estudiar propiedades que contribuyen a la supervivencia de aislamientos ambientales, obtenidos en el proyecto Gebix, y de analizar la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos en el ambiente. El grupo está conformado en general por investigadores con preparación en biología, microbiología, bioinformática y química y cuenta con la capacidad para realizar estudios de comunidades microbianas a partir de cultivos y por técnicas cultivo-independientes, así como para realizar la caracterización fenotípica de aislamientos, como se propone en este estudio.

##### **- Bioinformática y Biología Computacional - CorpoGen**

Este grupo fue creado en el año 2010 y está avalado por Colciencias desde 2013 en categoría C, es liderado por el doctor Juan Manuel Anzola, Ph.D. El grupo ha sido muy importante para el desarrollo de la infraestructura computacional de CorpoGen y su trabajo ha sido

transversal a todos los proyectos llevados a cabo en la corporación. El trabajo incluye el desarrollo de plataformas para análisis de secuenciación masiva, análisis de expresión diferencial de genes, genómica comparativa, ensamblaje y anotación de genomas, evolución de patógenos, evolución de familias de genes, diversidad microbiana por 16S rRNA y métodos computacionales de clasificación. El grupo ha graduado un estudiante de pregrado y dos de maestría.

Corpogen, en el transcurso de varios años de trabajo, ha entrenado tanto jóvenes investigadores como estudiantes de diferentes universidades mediante tesis de doctorado, maestría y pregrado.

#### **– Grupo de investigación de la Fundación Santafe: Departamento de Patología FSFB – Universidad de los Andes – Enfermedades Complejas**

El investigador principal y los co-investigadores del estudio tienen registrada su hoja de vida en CvLAC. La Dra. Ana Margarita Baldión cuenta con estudios de postgrado y entrenamiento avanzado en Patología Anatómica y Clínica. Además, participa en actividades de docencia en la Universidad de los Andes y Universidad Javeriana y es médico institucional en la Fundación Santa Fe de Bogotá y ha participado en la producción de varios artículos publicados en revistas especializadas y su experiencia está enfocada en el estudio de la patología pulmonar y en el manejo de temas relacionados con el Laboratorio Clínico .

El Departamento de Patología y Laboratorios de la Fundación Santa Fe de Bogotá, presta en la actualidad un servicio de diagnóstico y de consultoría a nivel nacional en múltiples campos; cuenta con un Laboratorio Clínico de alta complejidad en el que se incluye el área de Microbiología y Biología Molecular.

El Dr, Andrés Felipe Yepes es Médico general de la Universidad Surcolombiana de Neiva y médico residente de último año de la Universidad del Rosario del Programa de Medicina Crítica y Cuidado Intensivo.

#### **4.7. Cronograma de Actividades:**

Número	Actividad	Desde	Hasta	Tiempo
1	Permisos y toma de muestras	1	14	Meses
10	Informe 1	12	12	Meses
11	Informe 2	24	24	Meses
12	Informe 3	30	30	Meses
13	Revisión y actualización de literatura	1	30	Meses
2	Aislamiento de ADN	4	14	Meses
3	Aislamiento de microorganismos	2	14	Meses
4	Preparación de librerías metagenómicas	10	15	Meses
5	Análisis de biopelículas	2	18	Meses
6	Secuenciación y análisis	15	18	Meses
7	Análisis de resistencia a antibióticos de aislamientos	2	16	Meses
8	Integración de datos y análisis	18	27	Meses
9	Preparación y sometimiento artículos	20	30	Meses

#### 4.8. Presupuesto:

Este presupuesto de tiempo de dedicación Investigadores Fundación Santa Fe.

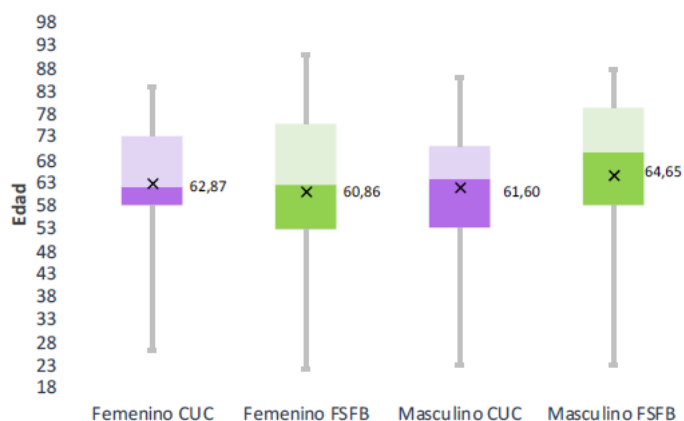
Margarita Baldion	Médico-Patologo Hospital Universitario Fundación Santafé de Bogota	Investigador Principal. Diseño, dirección y coordinación, del estudio y publicación	4H/SEM	\$12.000.000
Andres Yepes	Residente de Cuidado Intensivo	Co- investigador	6 H/SEM	\$6.750.000

Presupuesto previamente aprobado por Colciencias, para la entidad ejecutora, Corporación Corpogen.

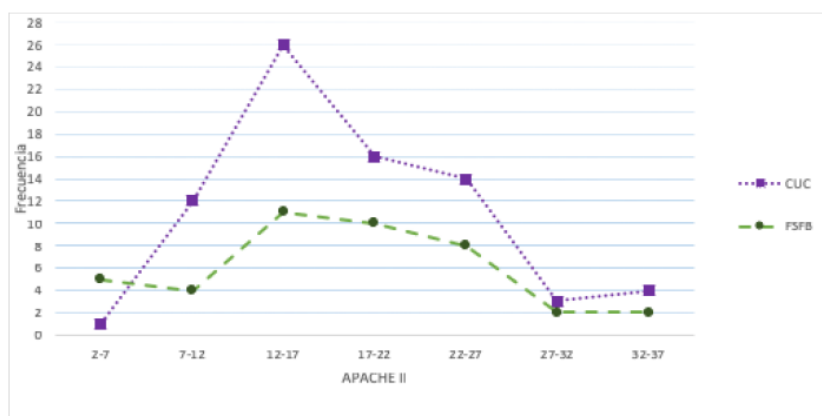
Rubros	PRESUPUESTO APROBADO			
	COLCIENCIAS	Contrapartida		Total
	Financiado	Ejecutora(s) Corpogen	Otras BIOS	
<b>EQUIPOS</b>	<b>2.749.900</b>	<b>71.989.731</b>	<b>28.197.242</b>	<b>102.936.873</b>
<b>MATERIALES E INSUMOS</b>	<b>12.000.000</b>	<b>5.000.000</b>		<b>17.000.000</b>
<b>PERSONAL CIENTÍFICO</b>	<b>144.544.128</b>	<b>53.400.000</b>		<b>197.944.128</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>6.000.000</b>			<b>6.000.000</b>
<b>SERVICIOS TECNICOS</b>	<b>115.144.128</b>	<b>2.000.000</b>		<b>117.144.128</b>
<b>SOFTWARE</b>	<b>2.500.000</b>			<b>2.500.000</b>
<b>VIAJES</b>	<b>8.100.000</b>	<b>4.200.000</b>	<b>1.200.000</b>	<b>13.500.000</b>
<b>GASTOS DE OPERACIÓN</b>	<b>18.500.000</b>	<b>6.500.000</b>		<b>25.000.000</b>
<b>SEGUIMIENTO Y EVALUACION</b>	<b>15.476.908</b>			<b>15.476.908</b>
<b>Totales</b>	<b>325.015.064</b>	<b>143.089.731</b>	<b>29.397.242</b>	<b>497.502.037</b>

## 5. Resultados:

La población estudiada presentó una distribución homogénea en las dos UCI (la edad media de los pacientes de sexo femenino estuvo entre 60 y 62 años y masculino entre 61 y 64 años para las UCI clínica Colombia y Fundación Santa Fe, respectivamente) (**Grafica 1**). El puntaje APACHE II indicó también que para las dos UCI el rango donde se ubicaron la mayoría de los pacientes fue entre 12 y 17 puntos (**Grafica 2**). La principal causa de inmunosupresión en los pacientes de las dos UCI fue el antecedente oncológico (**Tabla 1**). Pese a que la distribución de las variables analizadas fue muy similar en las dos UCI, se encontró que la principal diferencia se relacionaba con los días de intubación, en donde el período máximo para los pacientes de la fundación Santa Fe fue de 12 días y para los pacientes de la clínica Colombia de 21 días. (**Grafica 3**)



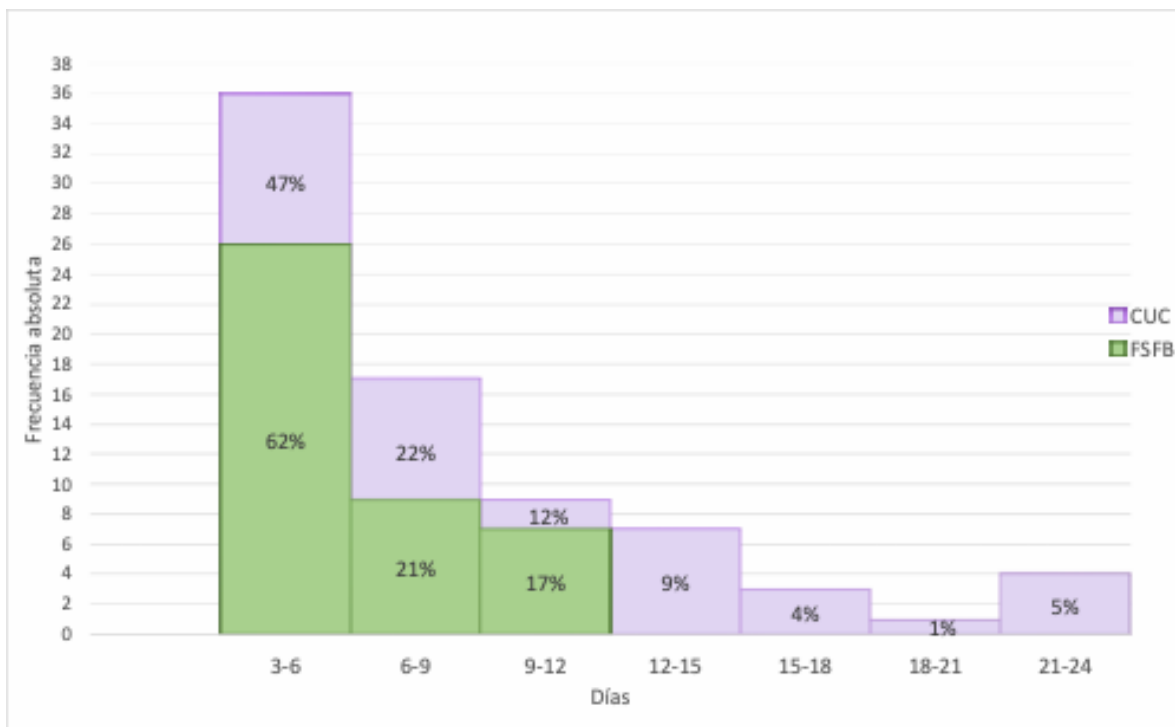
**Gráfica 1:** Distribución por edad y sexo de pacientes que formaron parte del estudio para cada una de las UCI.



**Gráfica 2:** Frecuencia absoluta de puntaje APACHE II de los pacientes que formaron parte del estudio para cada una de las UCI.

Condición de inmunosupresión	CUC		FSFB	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
VIH	1	1%	0	0%
Antecedente oncológico	21	28%	4	10%
Trasplante	2	3%	1	2%
Uso de esteroides	5	7%	0	0%
Otras causas de inmunosupresión	3	4%	6	14%
Sin condición de inmunosupresión	44	59%	31	74%
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>100%</b>	<b>42</b>	<b>100%</b>

**Tabla 1:** Frecuencia absoluta y relativa de las principales condiciones de inmunosupresión de los pacientes que formaron parte del estudio para cada una de las UCI.



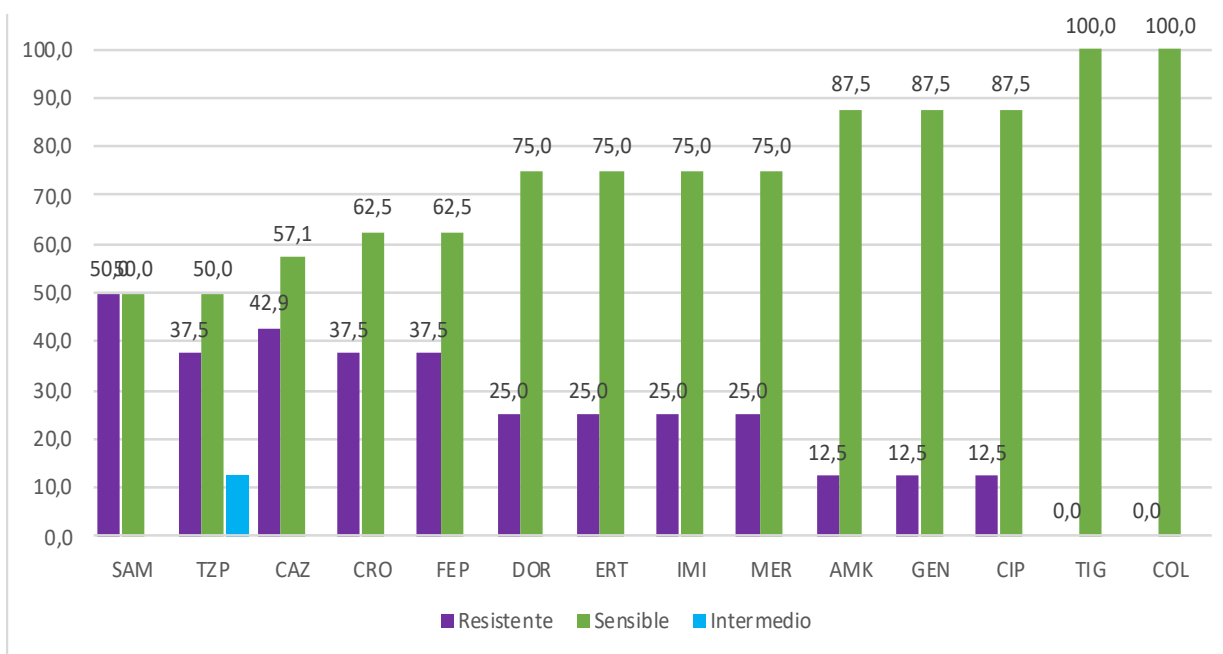
**Gráfico 3:** Frecuencia absoluta de días de intubación de los pacientes que formaron parte del estudio.

estudio para cada una de las UCI.

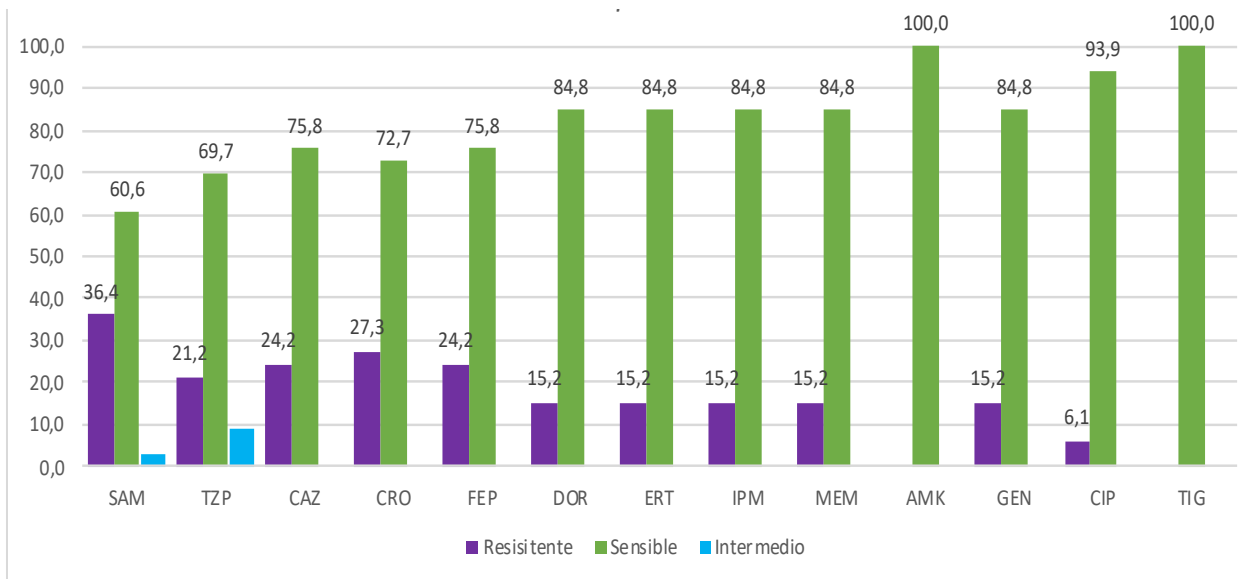
	<b>CUC</b>	<b>FSFB</b>
	(n=75)	(n=42)
<b>Estancia hospitalaria previa mayor a 48 horas</b>	16%	40%
<b>Diagnóstico de Neumonía en la UCI</b>	23%	12%
<b>Episodio previo de intubación orotraqueal</b>	16%	21%
<b>Motivo de extubación</b>		
Mejoría	37%	69%
Fallecimiento	48%	12%
Traqueostomía	15%	19%
<b>Uso de antibióticos previo a la entrada hospitalaria</b>		
Macrólidos	0%	0%
Aminoglucosidos	0%	0%
Betalactámicos	5%	7%
Quinolonas	0%	0%
Glicopéptidos	3%	5%
<b>Uso de antibióticos previa entrada a UCI</b>		
Macrólidos	5%	12%
Aminoglucosidos	1%	7%
Betalactámicos	61%	24%
Quinolonas	0%	0%
Glicopéptidos	9%	2%
<b>Uso de antibióticos durante la estancia en UCI</b>		
Macrólidos	5%	14%
Aminoglucosidos	4%	5%
Betalactámicos	88%	50%
Quinolonas	4%	7%
Glicopéptidos	16%	19%

**Tabla 2:** Frecuencia relativa de estancia hospitalaria previa, diagnóstico de neumonía en la UCI, episodio previo de intubación orotraqueal, motivo de extubación y uso de antibióticos de los pacientes que formaron parte del estudio para cada una de las UCI.

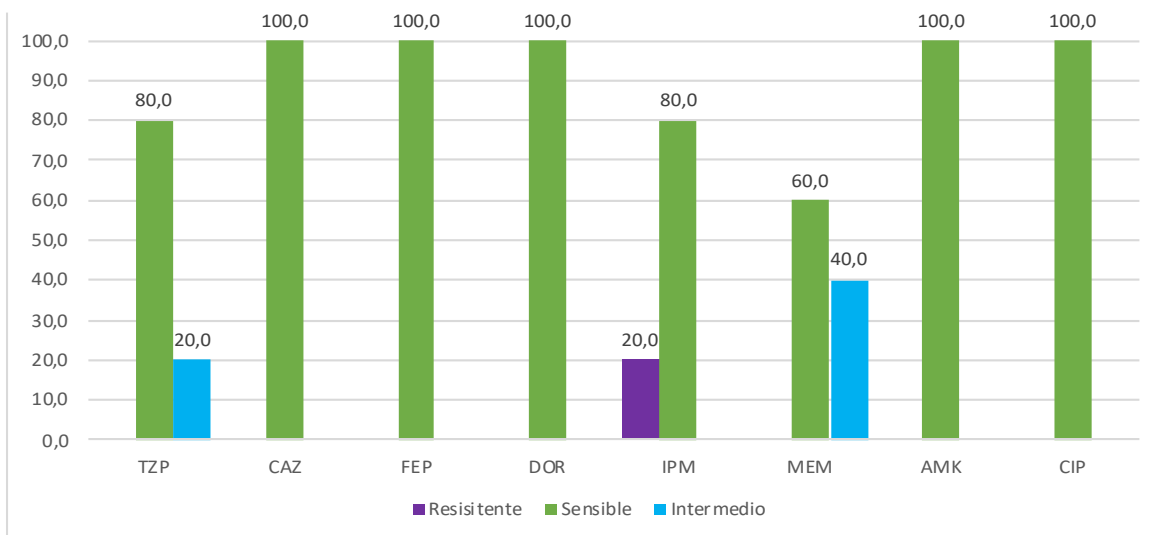
Las muestras recolectadas correspondieron a 87 cepas provenientes de la Fundación Santa Fe de Bogotá, recuperadas de 41 muestras, y 165 cepas de la Clínica Universitaria Colombia, recuperadas de 75 muestras, de las cuales el 44% y 54% respectivamente correspondieron a microorganismos pertenecientes al grupo ESKAPE. El análisis de los perfiles de resistencia se realizó para los microorganismos pertenecientes a este grupo mediante antibiograma, en el cual se encontró que para las cepas de *K. pneumoniae* provenientes de la UCI de la Fundación Santa Fe la resistencia a Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas fue mayor (50% SAM y 37,5% TZP) comparado con la Clínica Universitaria Colombia (37,5% SAM y 21,2% TZP) (**Grafica 4 y 5**). También se evidenció que en esta UCI la resistencia al grupo de Betalactámicos (cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos) es mayor. Sin embargo, para *P. aeruginosa* se encontró que la resistencia a Betalactámicos con y sin inhibidor es mayor en las cepas recuperadas de la UCI de la Clínica Colombia, con porcentajes del 26,7% para CAZ y FEP, 35,3% y 40% para DOR e IPM, respectivamente; mientras que las cepas obtenidas de la UCI Fundación Santa Fe, fueron sensibles en su mayoría a los antibióticos evaluados (**Graficas 6 y 7**). En el caso de los aislamientos de *Enterobacter cloacae complex* se encontró 25% de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, así como resistencia del 25% a TZP y 75% a SAM, en las cepas provenientes de la UCI clínica Colombia. Para la UCI Fundación Santa Fe todos los aislamientos obtenidos fueron resistentes a SAM (**Graficas 8 y 9**). En *E. coli* los perfiles de resistencia para las dos UCI fueron similares, encontrándose cepas 100% sensibles a carbapenémicos y con porcentajes de resistencia del 33-50% a cefalosporinas de tercera generación y betalactámicos con inhibidor (**Grafica 10 y 11**). Los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de la Fundación Santa Fe, presentaron porcentajes de resistencia del 44% a CLI y ERI y del 11.1% a OXA, mientras que para los obtenidos de la Clínica Colombia fueron del 8,3% para CLI y ERI y del 16,3% para OXA. (**Grafica 12 y 13**).



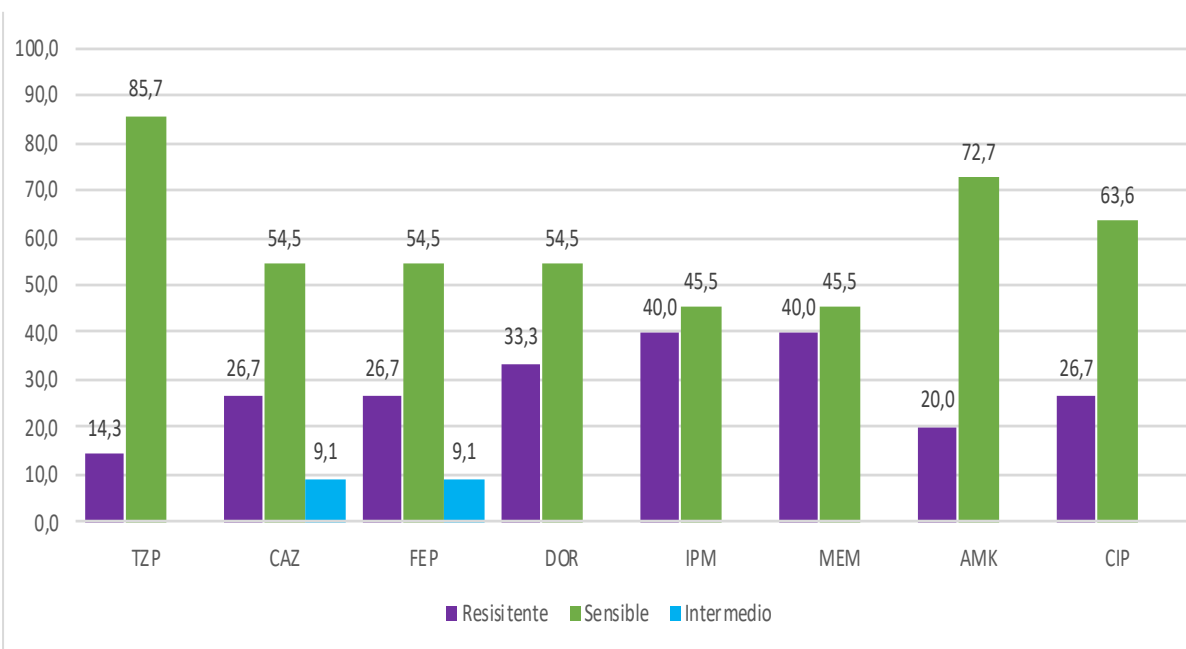
**Gráfica 4.** Perfil de resistencia de cepas de *K. pneumoniae* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI clínica Colombia. (n=35)



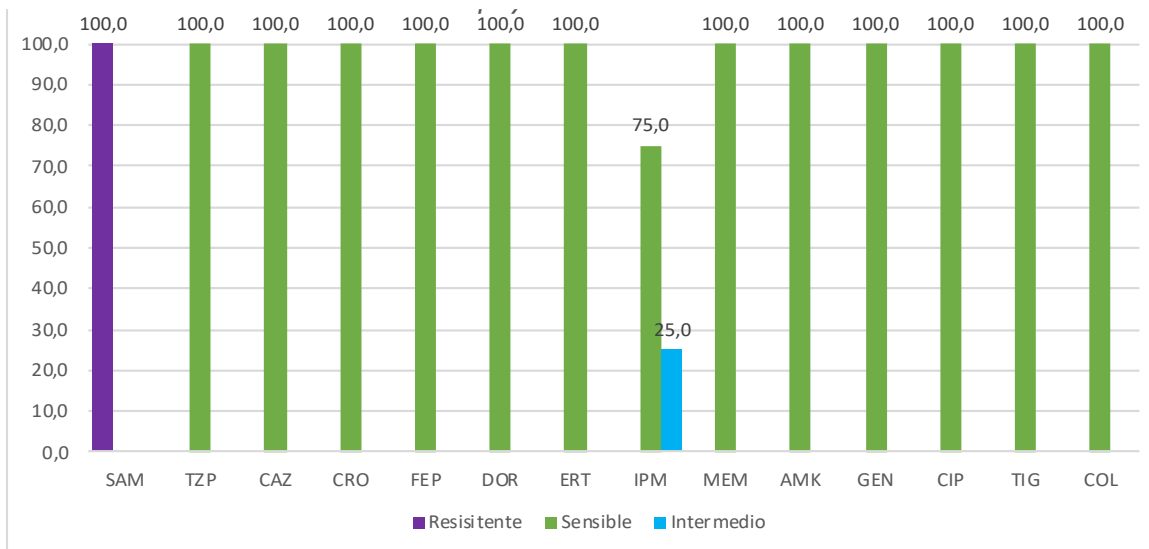
**Gráfica 5.** Perfil de resistencia de cepas de *K. pneumoniae* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI Fundación Santa Fe. (n=8)



**Gráfica 6.** Perfil de resistencia de cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI Fundación Santa Fe. (n=4)



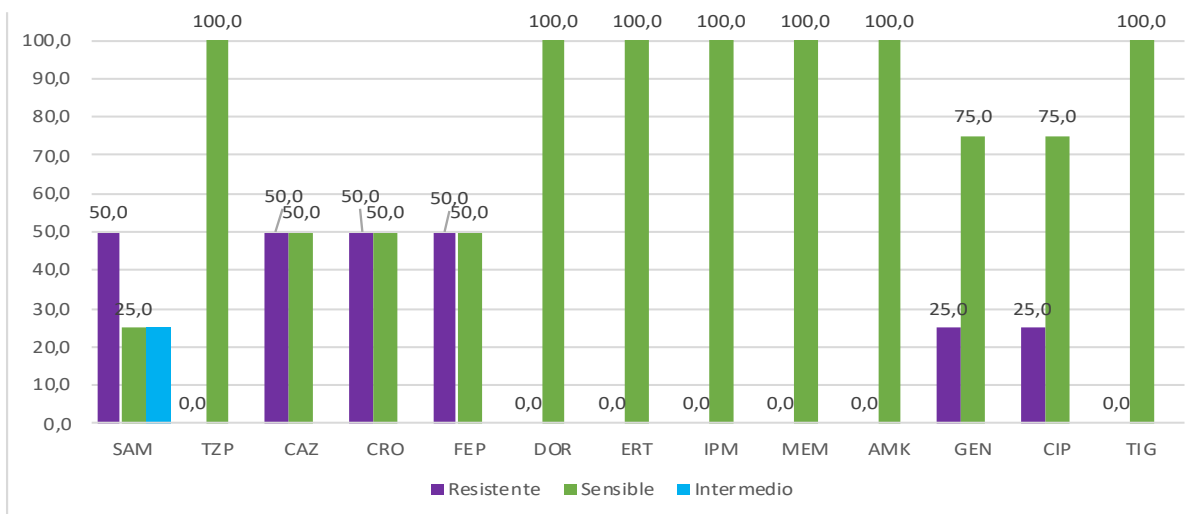
**Gráfica 7.** Perfil de resistencia de cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI Clínica Colombia. (n=11)



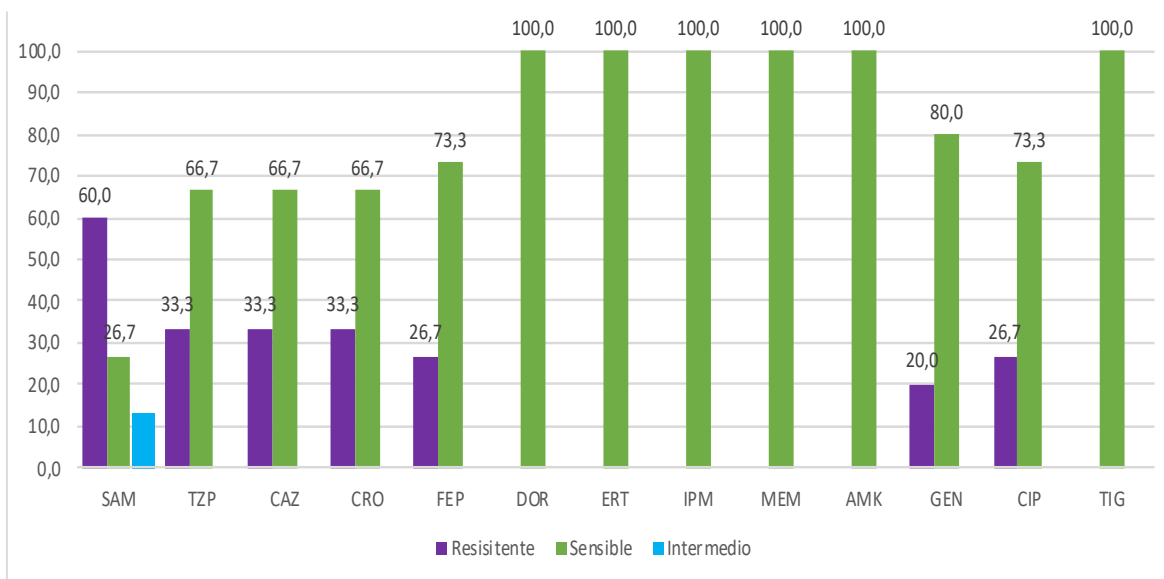
**Gráfica 8.** Perfil de resistencia de cepas de *Enterobacter cloacae complex* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI Fundación Santa Fe. (n=4)



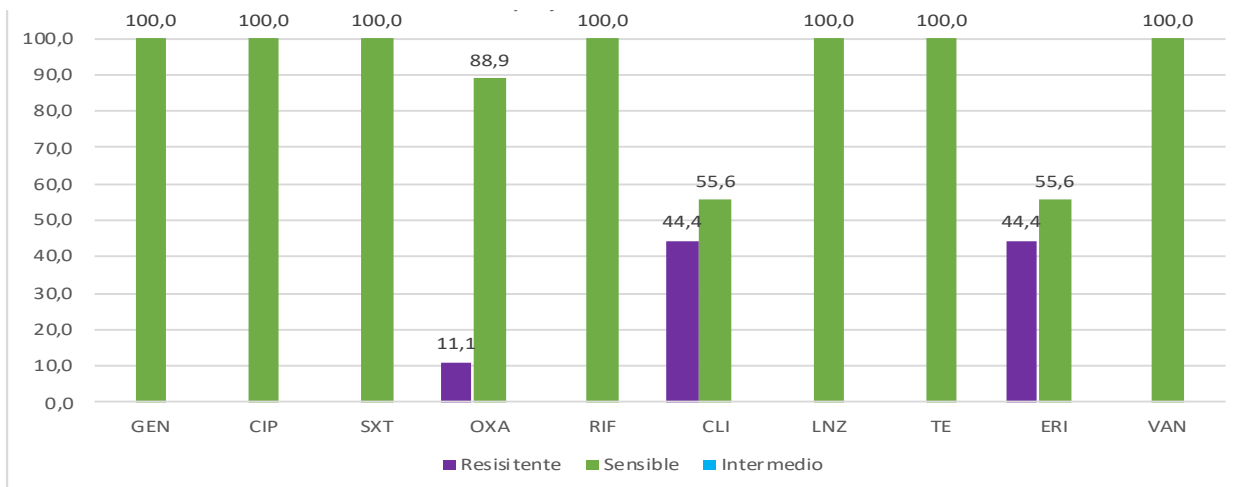
**Gráfica 9.** Perfil de resistencia de cepas de *Enterobacter cloacae complex* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI Clínica Colombia (n=10)



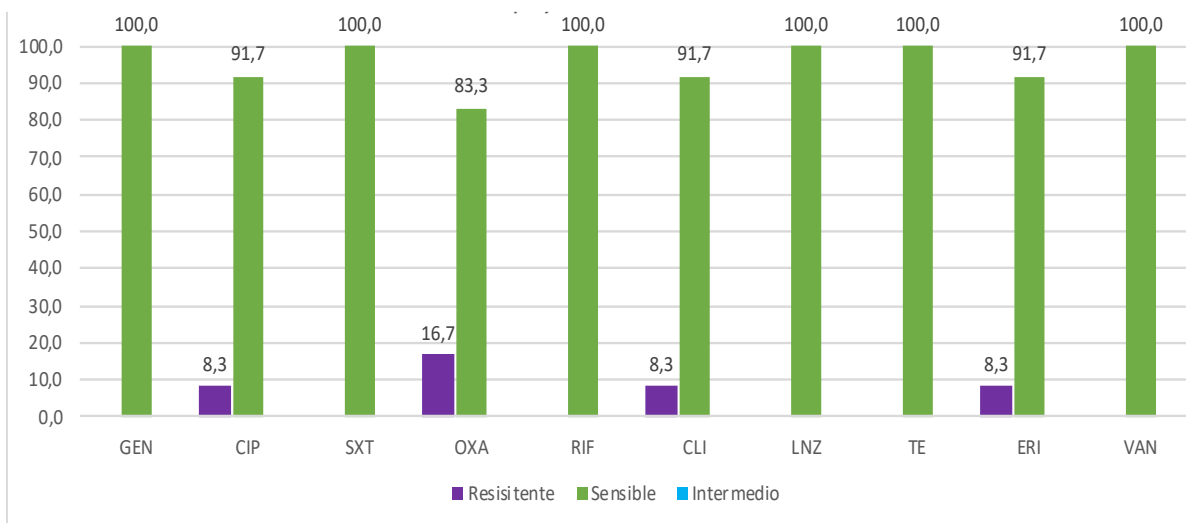
**Gráfica 10.** Perfil de resistencia de cepas de *E. coli* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI Fundación Santa Fe (n=4)



**Gráfica 11.** Perfil de resistencia de cepas de *E. coli* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI Clínica Colombia (n=17)



**Gráfica 12.** Perfil de resistencia de cepas de *S. aureus* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI Fundación Santa Fe (n=9)



**Gráfica 13.** Perfil de resistencia de cepas de *S.aureus* obtenidas de tubo orotraqueal de UCI Clínica Colombia (n=17)

La evaluación de formación de biopelícula fue realizada en 65 microorganismos pertenecientes al grupo ESKAPE, de acuerdo al protocolo estandarizado previamente. Se obtuvo que *K. pneumoniae* además de ser el microorganismo más prevalente en las dos unidades de cuidados intensivos, también fue el patógeno con mayor capacidad de formación de biopelícula, seguido por *P. aeruginosa*, mientras que las cepas de *E. coli* y *S. aureus* evaluadas fueron débiles y moderadas productoras de biopelícula

La evaluación de la concentración mínima de erradicación en biopelícula (MBEC) se realizó en 4 cepas (dos de cada UCI) de *K. pneumoniae* fuertes formadoras de biopelícula y sensibles a carbapenémicos. Se evaluó la concentración mínima inhibitoria de estas cepas frente al MBEC para meropenem, uno de los antibióticos más utilizados en la UCI. Los resultados obtenidos de esta evaluación indicaron que las cepas formadoras de biopelícula que inicialmente fueron sensibles a este antibiótico en estado plantónico aumentan hasta 8 veces su resistencia al encontrarse en estado de biopelícula. (**Tabla 3**)

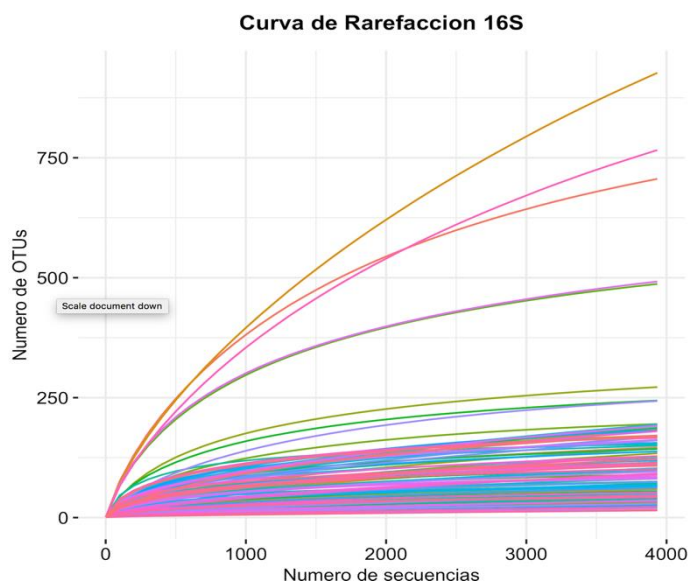
Procedencia	Cepa	MIC (µg/mL)	Interpretación	MBEC (µg/mL)	Interpretación
Fundación Santa Fe	32	≤ 0,25	Sensible	≥128	Resistente
	41	≤ 0,25	Sensible	≥64	Resistente
	59	≤ 0,25	Sensible	≥128	Resistente

<b>Clínica Universitaria Colombia</b>	60	$\leq 0,25$	Sensible	$\geq 128$	Resistente
---	----	-------------	----------	------------	------------

**Tabla 3.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) vs concentración mínima de erradicación en biopelícula de meropenem (MBEC) para cepas de *Klebsiella pneumoniae* fuertes y moderadas productoras de biopelícula.

Mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA, fue posible caracterizar la microbiota de 103 muestras de tubos orotraqueales, a través del flujo de trabajo de mothur, el cual consiste fundamentalmente en tres pasos: 1. Reducción de secuencias y errores de PCR, 2. Procesamiento de secuencias mejorada, es decir: unificación, verificación de solapamiento, filtrador de secuencias y remoción de quimeras. 3. Análisis de alfa y beta diversidad. La curva de rarefacción generada indica que a 3934 secuencias la mayoría de las muestras ya están saturadas, lo cual asegura que la profundidad de secuencias es suficiente para cubrir la diversidad presente en las mismas. **(Gráfica 14)**

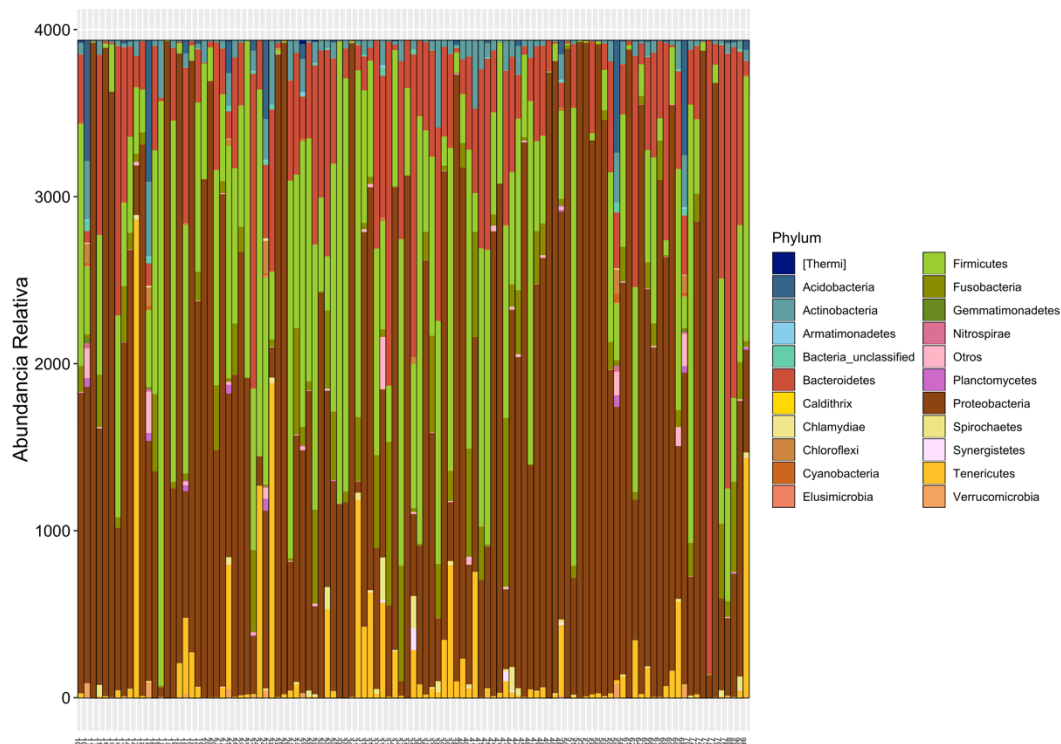
### Análisis de alfa diversidad



**Gráfico 14.**

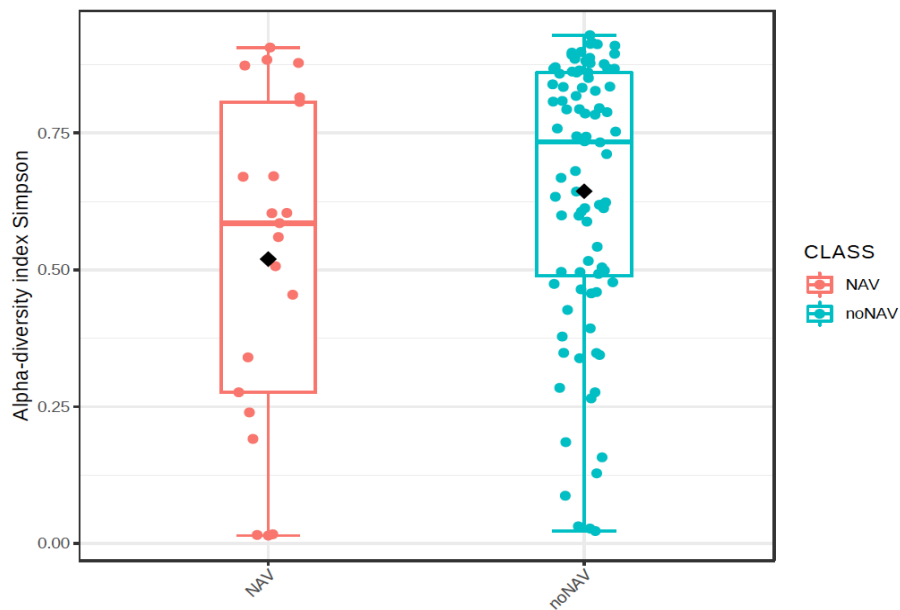
Curva de rarefacción normalizada para las 113 muestras que hicieron parte del estudio.

El análisis de alfa diversidad, realizado para caracterizar la composición de las comunidades entre las diferentes muestras indicó que a nivel de filo, los taxones más frecuentes en las muestras analizadas fueron Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes. **(Gráfica 15)**

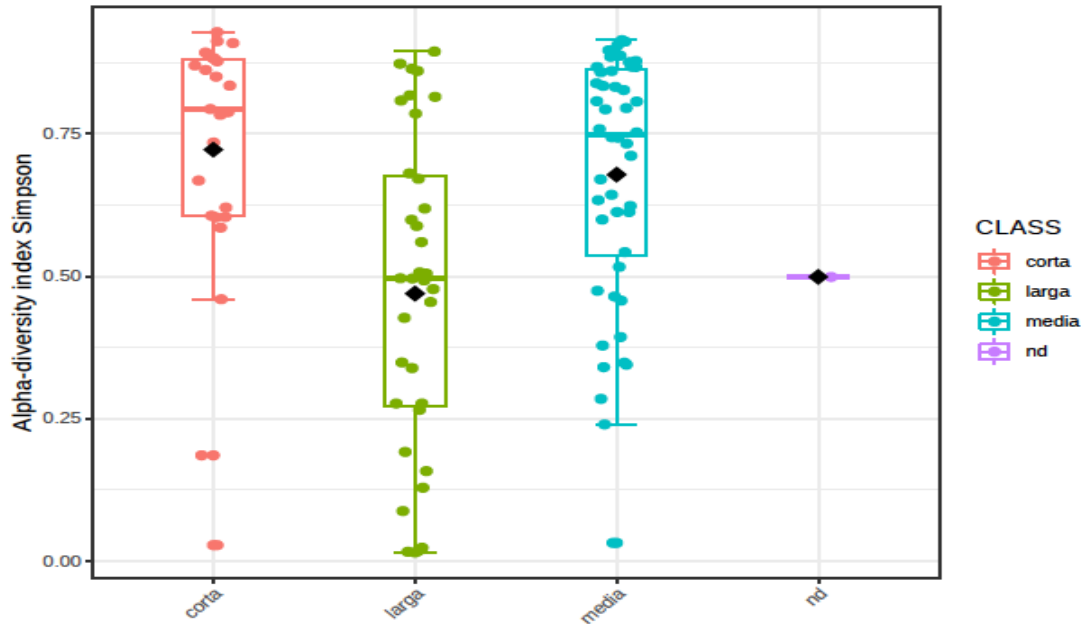


**Gráfica 15.** Abundancia relativa (Filo).

El análisis de beta diversidad fue realizado entre muestras con el objetivo de conocer si existían diferencias de diversidad entre el grupo de pacientes con y sin NAV, para lo cual se calculó el índice de Simpson. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes (**Gráfica 16 Y 17**)

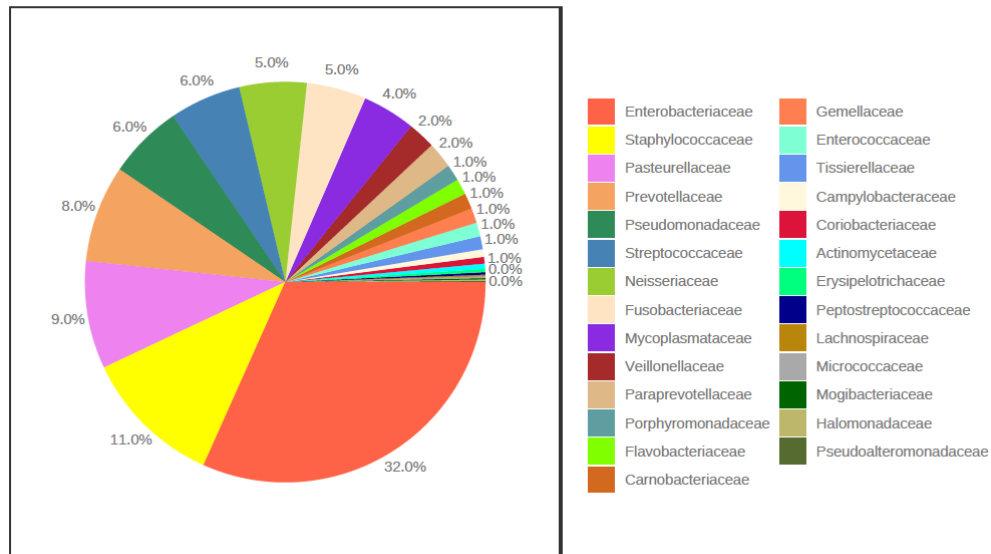


**Gráfica 16.** Box plot del índice de diversidad de Simpson para las características de diagnóstico de neumonía en la UCI (NAV: pacientes con neumonía asociada a ventilación) (noNAV: pacientes sin diagnóstico de neumonía asociada a ventilación). Test estadístico: U de Mann Whitney p-value:0,46

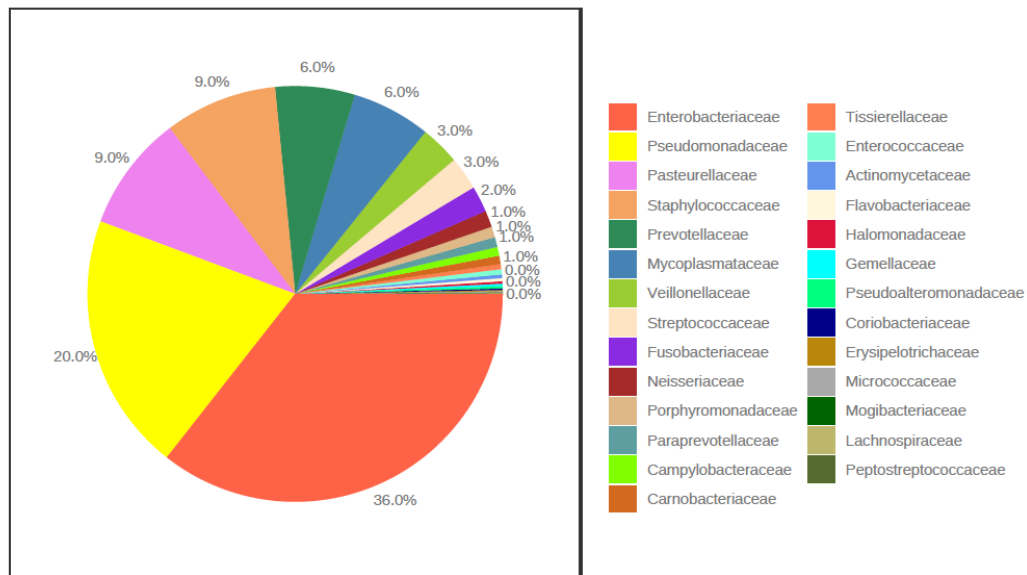


**Gráfica 17.** Box plot del índice de diversidad de Simpson para las características de tiempo de intubación (Corta:3 a 5 días, Media: 6 a 12 día, Larga: 13 a 21 días, ND: dato no disponible ) Test estadístico: U de Mann Whitney p-value: 0.00024397

Por otro lado, al comparar a nivel Familia se encontró que en los pacientes con diagnóstico de NAV se encuentran en una mayor proporción las familias Enterobacteriaceae y Pseudomonacea, 36% y 20% respectivamente, frente a un 32% y 11% para estas mismas familias en pacientes sin NAV (**Grafica 18 y 19**)



**Gráfica 18:** Gráfica de sectores de las principales familias encontradas en pacientes sin diagnóstico de neumonía asociada a ventilación.



**Gráfico 19:** Gráfico de sectores de las principales familias encontradas en pacientes con diagnóstico de neumonía asociada a ventilación.

Es importante resaltar la prevalencia de formación de biopelícula de los aislamientos obtenidos, así como las diferencias presentadas en los perfiles de resistencia de las bacterias en biopelícula frente a su estado planctónico. Los hallazgos aquí presentados generan un base de información sobre la microbiota en pacientes en UCI que aporta a la comunidad

científica y a estudios futuros orientados a generar mejoras en la terapia antibiótica que pueda beneficiar la calidad de vida del paciente y reducir la carga de la enfermedad para el sistema de salud.

## 6. Discusión y Conclusiones

Entre diciembre de 2016 y diciembre de 2017 se recolectaron 116 muestras provenientes de dos UCI en Bogotá, Colombia. De los microorganismos obtenidos mediante cultivo, se observó una alta prevalencia de bacterias pertenecientes al grupo ESKAPE. Estos datos concuerdan con lo obtenido no solo a nivel nacional [78][79] sino también con la información reportada en el último informe de la OMS sobre la carga de enfermedad de IAAS [80]. En ese reporte se estimó que la alta frecuencia de estas infecciones intrahospitalarias se encuentra relacionado principalmente al uso de dispositivos médicos invasivos, de los cuales el 83% corresponde al uso de tubos orotraqueales. Entre los principales agentes etiológicos causantes de IAD están microorganismos como *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, cuya importancia se debe también a su elevada resistencia a la antibioticoterapia. Nuestros resultados también concuerdan con dicho reporte, en tanto mediante los cultivos de gérmenes comunes realizados con los tubos orotraqueales se encontró que en las dos UCI observadas *K. pneumoniae* fue el microorganismo más prevalente. También es importante resaltar el hallazgo de hongos levaduriformes recuperados en el cultivo de gérmenes comunes, lo que puede obedecer a una selección previa debido al tratamiento empírico de antibióticos usado de rutina en este tipo de pacientes.

Las cepas bacterianas aisladas de los tubos orotraqueales mostraron un alto porcentaje de resistencia a Betalactámicos, especialmente a aquellos con inhibidor y cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, ceftazidima y cefepime). La resistencia a este tipo de antibióticos en Colombia ha incrementado con el paso de los años. En este sentido la formación de biopelículas por parte de microorganismos de importancia clínica constituye un importante mecanismo adicional de resistencia frente a los principales antibióticos de uso hospitalario, ya que la biopelícula al ser una estructura tridimensional y recubierta de los polisacáridos producidos por los propios microorganismos, puede retardar la penetración del antibiótico al interior de dicha estructura multicelular, generando nichos que permiten entre 100 a 1000 veces más resistencia a los antibióticos y desinfectantes[81].

En este proyecto se evaluó la formación de biopelículas en bacterias pertenecientes al grupo ESKAPE, puesto que previamente se ha reconocido que más del 80% de las IAD en las UCI, especialmente la NAV, tiene como agente etiológico alguno de estos microorganismos [82]. Los datos aquí presentados indican que *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* son las bacterias con mayor capacidad de formación de biopelícula, lo cual es muy significativo debido a la frecuencia de estos patógenos en hospitales y su capacidad para resistir el tratamiento. Resultados que igualmente corroboran lo que se ha obtenido por medio estudios indirectos sobre la prevalencia de los microorganismos asociados a dispositivos médicos. Como se mencionó previamente, en este estudio se determinó la capacidad de erradicación del antibiótico de la bacteria en estado de biopelícula utilizando la técnica de MBEC y se observó que para las cepas de *K. pneumoniae* se aumenta hasta en 8 veces la resistencia a meropenem cuando las bacterias están en biopelículas. Datos que concuerdan con lo que ha sido reportado en la literatura previamente, donde se analiza que los antibióticos influyen de manera directa

en la resistencia a los antibióticos incluso algunas veces aumentando la formación de la biopelícula.

En este trabajo se detectó una alta incidencia de biopelículas sobre los tubos orotraqueales (61%), un dato muy importante de resaltar debido a que los patógenos recuperados y con capacidad de formación de biopelícula presentan resistencia hacia la terapia antibiótica inicial lo que puede llevar a fracasos terapéuticos en el manejo de los pacientes en la UCI y especialmente los que pueden llegar a desarrollar NAV. Esto sumado a los ensayos de MBEC que evaluaron la resistencia a meropenem uno de los antibióticos de uso más frecuente en la UCI, puede prender las alarmas y permitir cambios en los tratamientos usados a diario en dichos pacientes, así como aumentar los esfuerzos por retirar tempranamente el soporte ventilatorio.

Un estudio realizado en Bogotá, reportó la presencia de *K. pneumoniae* con un perfil de multiresistencia a betalactámicos en diversas muestras de infecciones a nivel hospitalario [83], coincidiendo con los datos aquí presentados para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* en el cual los porcentajes de resistencia en el servicio UCI de adultos son elevados en estos microorganismos para cefalosporinas de cuarta generación, carbapenémicos y betalactámico más inhibidor de  $\beta$ -lactamasa [79], antibióticos que son utilizados como tratamiento empírico ante la sospecha de NAV [84]. Por otro lado, un estudio a partir de la vigilancia epidemiológica activa de IAAS en nueve hospitales colombianos durante tres años encontró que la resistencia a piperacilina/tazobactam fue de 33.3%, 50% a ceftazidima y 19% a imipenem [85]. Porcentajes similares a lo obtenido en este estudio en microorganismos no productores de biopelículas. Sin embargo, al contrastar con los productores de biopelícula es posible notar que la frecuencia de resistencia a los antibióticos de amplio espectro usados como tratamiento empírico es mayor, especialmente para *E. coli* y *Klebsiella sp.*, lo cual nuevamente resalta la importancia de considerar la producción de biopelícula como un importante factor de riesgo para el fracaso terapéutico.

Desde otra perspectiva, en los estudios independientes de cultivo mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA fue posible conocer por primera vez, a nivel local, la composición de la microbiota que se encuentra en el tubo orotraqueal. Estos resultados presentan una visión distinta a lo que se obtiene tradicionalmente por cultivo y permiten asociaciones de las comunidades microbianas con características clínicas y demográficas de los pacientes, teniendo en cuenta el contexto de la NAV. Se encontraron phylum predominantes en ambos grupos, pacientes con y sin NAV, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a nivel de alfa diversidad, lo cual coincide con datos obtenidos en un estudio similar en donde no se encontraron diferencias en las poblaciones bacterianas de pacientes con y sin NAV [86], los datos aquí presentados fueron analizados por dos flujos de trabajos diferentes QIIME2 y mothur, los resultados obtenidos por los dos flujos de trabajo concuerdan en la ausencia de estas diferencias ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, en este estudio sí se encontraron diferencias significativas en algunos niveles taxonómicos, como la presencia de la familia Pseudomonadaceae en pacientes con NAV. Así mismo los datos obtenidos por cultivo indicaron que en este grupo de pacientes *P. aeruginosa* fue uno de los microorganismos más prevalentes. La mayor proporción de esta familia Pseudomonadaceae, perteneciente al phylum Proteobacteria. Por otro lado, en los pacientes con NAV disminuye la abundancia relativa de otros Filos como firmicutes, del cual previamente se ha reconocido que este grupo pertenece a la microbiota habitual de la cavidad oro-faríngea [83].

Por otra parte, los resultados obtenidos indican que existe una relación directamente proporcional entre los días de intubación y la formación de biopelícula. Esto permite inferir que la formación de biopelícula puede estar asociada con el desarrollo de infección, es decir NAV, debido a que entre mayor es el tiempo (días) de intubación la posibilidad de generar biopelícula aumenta, previamente se ha encontrado que un período de tiempo de intubación mayor a 8 días representa un factor de riesgo para el desarrollo de NAV, porque se genera colonización de los tubos orotraqueales y posterior producción de biopelícula [87]. Estos resultados están de acuerdo, con reportes que muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre un mayor promedio de días de intubación y NAV [88] [89]. Igualmente, ha sido reportado que períodos largos de intubación pueden favorecer la colonización de microorganismos patógenos como levaduras, afectando negativamente el pronóstico del paciente. Lo cual coincide con nuestro estudio en donde en un número bajo de muestras se obtuvo el crecimiento de levaduras.

En nuestros análisis se encontraron diferencias significativas en los períodos de extubación, los datos indicaron que entre mayor es el período de intubación la diversidad microbiana de las muestras disminuye. Previamente se ha reportado que períodos de intubación prolongados pueden generar que la microbiota habitual se disminuya, favoreciendo la colonización por parte de microorganismos patógenos y oportunistas [91]. Lo que coincide con lo que nosotros estamos reportando por primera vez en un estudio aquí en Colombia con datos de nuestros pacientes. Esto también está de acuerdo a un estudio previo que evaluó la colonización de los tubos orotraqueales encontrando que entre mayor es el tiempo de intubación, la posibilidad de encontrar patógenos como *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* aumenta. Estas bacterias tienen la capacidad de colonizar estos tubos lo que puede llevar a una NAV [90].

Como conclusiones podemos puntualizar lo siguiente:

- Este estudio es el primero en Colombia que permite un conocimiento general de la microbiota de los tubos orotraqueales en pacientes sometidos a intubación, indicando diferencias en algunas familias bacterianas en pacientes con y sin neumonía.
- Este estudio muestra la prevalencia de bacterias formadoras de biopelícula de los aislamientos obtenidos y diferencias en los perfiles de resistencia en biopelícula vs. su estado planctónico.
- De acuerdo a lo que se ha reportado previamente, nosotros corroboramos que *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* son las bacterias patógenas más prevalentes en pacientes que requieren tubo orotraqueal y pueden desarrollar NAV.
- Los hallazgos aquí presentados además de generar un aporte a la comunidad científica también pueden servir de insumo para mejorar el enfoque hacia la terapia antibiótica con miras a mejorar la calidad de vida del paciente y reducir la carga de la enfermedad para el sistema de salud.

## 7. Bibliografía:

- [1] S. Fukigai, J. Alba, S. Kimura, T. Iida, N. Nishikura, Y. Ishii, and K. Yamaguchi, “Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan.,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 29, no. 3, pp. 306–10, Mar. 2007.
- [2] H. Hanberger, L. G. Burman, O. Cars, M. Erlandsson, H. Gill, L. E. Nilsson, D. Nordlinder, and S. M. Walther, “Low antibiotic resistance rates in *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp but not in *Enterobacter* spp and *Pseudomonas aeruginosa*: a prospective observational study in 14 Swedish ICUs over a 5-year period.,” *Acta Anaesthesiol. Scand.*, vol. 51, no. 7, pp. 937–41, Aug. 2007.
- [3] S. D. Perkins, K. F. Woeltje, and L. T. Angenent, “Endotracheal tube biofilm inoculation of oral flora and subsequent colonization of opportunistic pathogens,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 300, no. 7, pp. 503–511, 2010.
- [4] J. W. Costerton, *Springer Series on Biofilms Series Editor : J . William Costerton*. 2007.
- [5] M. E. Davey and G. A. O’toole, “Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, no. 4, pp. 847–67, Dec. 2000.
- [6] R. M. Donlan and J. W. Costerton, “Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 15, pp. 167–193, 2002.
- [7] R. M. Donlan, “Biofilms and device-associated infections.,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 7, no. 2, pp. 277–81, Jan. .
- [8] P. S. Stewart and J. William Costerton, “Antibiotic resistance of bacteria in biofilms,” *Lancet*, vol. 358, no. 9276, pp. 135–138, Jul. 2001.
- [9] L. Izquierdo, “Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae*,” 2003.
- [10] J. L. Del Pozo, M. Alonso, C. R. Arciola, R. Gonzalez, J. Leiva, I. Lasa, and J. Penades, “Biotechnological war against biofilms. Could phages mean the end of device-related infections?,” *Int. J. Artif. Organs*, vol. 30, no. 9, pp. 805–12, Sep. 2007.
- [11] J. C. Post, P. Stoodley, L. Hall-Stoodley, and G. D. Ehrlich, “The role of biofilms in otolaryngologic infections.,” *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 12, no. 3, pp. 185–90, Jun. 2004.
- [12] A. Jayaraman and T. K. Wood, “Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease.,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 10, pp. 145–67, Jan. 2008.
- [13] H.-S. Joo and M. Otto, “Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens.,” *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 12, pp. 1503–13, Dec. 2012.
- [14] J. Chandra, L. Long, M. A. Ghannoum, and P. K. Mukherjee, “A rabbit model for evaluation of catheter-associated fungal biofilms.,” *Virulence*, vol. 2, no. 5, pp. 466–74, 2011.
- [15] J. A. Sanclement, P. Webster, J. Thomas, and H. H. Ramadan, “Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis.,” *Laryngoscope*, vol. 115, no. 4, pp. 578–82, Apr. 2005.
- [16] A. S. Lynch and G. T. Robertson, “Bacterial and fungal biofilm infections.,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 59, pp. 415–28, Jan. 2008.
- [17] J. L. del Pozo and R. Patel, “The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections.,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 82, no. 2, pp. 204–9, Aug. 2007.

- [18] A. Kramer, I. Schwebke, and G. Kampf, "How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review.," *BMC Infect. Dis.*, vol. 6, p. 130, Jan. 2006.
- [19] T. F. Mah and G. A. O'Toole, "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.," *Trends Microbiol.*, vol. 9, no. 1, pp. 34–9, Jan. 2001.
- [20] I. Vandecastelaere and T. Coenye, "Biofilm-based Healthcare-associated Infections," in *Biofilm-based Healthcare-associated Infections*, vol. 830, 2015, pp. 137–155.
- [21] P. Di Martino, N. Cafferini, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud, "Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces.," *Res. Microbiol.*, vol. 154, no. 1, pp. 9–16, Jan. .
- [22] C. Loo, W. Lee, P. M. Young, R. Cavaliere, and C. B. Whitchurch, "Implications and emerging control strategies for ventilator-associated infections," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 13, no. 3, pp. 379–393, 2015.
- [23] S. Cairns, J. G. Thomas, S. J. Hooper, M. P. Wise, P. J. Frost, M. J. Wilson, M. A. O. Lewis, and D. W. Williams, "Molecular analysis of microbial communities in endotracheal tube biofilms," *PLoS One*, vol. 6, no. 3, 2011.
- [24] I. Vandecastelaere, N. Matthijs, F. van Nieuwerburgh, D. Deforce, P. Vosters, L. de Bus, H. J. Nelis, P. Depuydt, and T. Coenye, "Assessment of microbial diversity in biofilms recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. 11–14, 2012.
- [25] a Abdollahi, S. Shoar, and N. Shoar, "Microorganisms' colonization and their antibiotic resistance pattern in oro - tracheal tube.," *Iran J Microbiol*, vol. 5, no. 2, pp. 102–107, 2013.
- [26] L. R. Peterson, "Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 49, no. 6, pp. 992–3, Sep. 2009.
- [27] R. M. Donlan and J. W. Costerton, "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 15, no. 2, pp. 167–93, Apr. 2002.
- [28] P. Watnick and R. Kolter, "Biofilm, city of microbes.," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 10, pp. 2675–9, May 2000.
- [29] M. A. Cooper and D. Shlaes, "Fix the antibiotics pipeline.," *Nature*, vol. 472, no. 7341, p. 32, Apr. 2011.
- [30] M. A. Sze, J. C. Hogg, and D. D. Sin, "Bacterial microbiome of lungs in COPD.," *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, vol. 9, pp. 229–38, Jan. 2014.
- [31] L. M. Proctor, "The Human Microbiome Project in 2011 and beyond.," *Cell Host Microbe*, vol. 10, no. 4, pp. 287–91, Oct. 2011.
- [32] J. R. Erb-Downward, D. L. Thompson, M. K. Han, C. M. Freeman, L. McCloskey, L. A. Schmidt, V. B. Young, G. B. Toews, J. L. Curtis, B. Sundaram, F. J. Martinez, and G. B. Huffnagle, "Analysis of the lung microbiome in the 'healthy' smoker and in COPD.," *PLoS One*, vol. 6, no. 2, p. e16384, Jan. 2011.
- [33] G. B. Rogers, D. Shaw, R. L. Marsh, M. P. Carroll, D. J. Serisier, and K. D. Bruce, "Respiratory microbiota: addressing clinical questions, informing clinical practice.," *Thorax*, vol. 70, no. 1, pp. 74–81, Jan. 2015.
- [34] C. M. Bassis, J. R. Erb-Downward, R. P. Dickson, C. M. Freeman, T. M. Schmidt, V. B. Young, J. M. Beck, J. L. Curtis, and G. B. Huffnagle, "Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals.," *MBio*, vol. 6, no. 2, p. e00037, Jan. 2015.

- [35] T. T. Bauer, a. Torres, R. Ferrer, C. M. Heyer, G. Schultze-Werninghaus, and K. Rasche, "Biofilm formation in endotracheal tubes. Association between pneumonia and the persistence of pathogens," *Monaldi Arch. Chest Dis. - Pulm. Ser.*, vol. 57, no. 1, pp. 84–87, 2002.
- [36] J. M. Beck, V. B. Young, and G. B. Huffnagle, "The microbiome of the lung.," *Transl. Res.*, vol. 160, no. 4, pp. 258–66, Oct. 2012.
- [37] A. T. Society, "Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 171, pp. 388–416, 2005.
- [38] J.-E. Berdal, J. Bjørnholt, A. Blomfeldt, N. Smith-Erichsen, and G. Bukholm, "Patterns and dynamics of airway colonisation in mechanically-ventilated patients.," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 13, no. 5, pp. 476–80, May 2007.
- [39] E. Giantsou, N. Liratzopoulos, E. Efraimidou, M. Panopoulou, E. Alepopoulou, S. Kartali-Ktenidou, and K. Manolas, "De-escalation therapy rates are significantly higher by bronchoalveolar lavage than by tracheal aspirate.," *Intensive Care Med.*, vol. 33, no. 9, pp. 1533–40, Sep. 2007.
- [40] S. Nseir and C.-H. Marquette, "Diagnosis of hospital-acquired pneumonia: postmortem studies.," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 17, no. 4, pp. 707–16, Dec. 2003.
- [41] D. J. Cook, S. D. Walter, R. J. Cook, L. E. Griffith, G. H. Guyatt, D. Leasa, R. Z. Jaeschke, and C. Brun-Buisson, "Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 129, no. 6, pp. 433–40, Sep. 1998.
- [42] N. N. I. S. (NNIS), "National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. A report from the NNIS System.," *Am. J. Infect. Control*, vol. 27, no. 6, pp. 520–32, Dec. 1999.
- [43] J. L. Vincent, D. J. Bihari, P. M. Suter, H. A. Bruining, J. White, M. H. Nicolas-Chanoine, M. Wolff, R. C. Spencer, and M. Hemmer, "The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee.," *JAMA*, vol. 274, no. 8, pp. 639–44, Jan. 1995.
- [44] S. Chevret, M. Hemmer, J. Carlet, and M. Langer, "Incidence and risk factors of pneumonia acquired in intensive care units. Results from a multicenter prospective study on 996 patients. European Cooperative Group on Nosocomial Pneumonia.," *Intensive Care Med.*, vol. 19, no. 5, pp. 256–64, Jan. 1993.
- [45] M. Leone, F. Garcin, J. Bouvenot, I. Boyadjev, P. Visintini, J. Albanèse, and C. Martin, "Ventilator-associated pneumonia: breaking the vicious circle of antibiotic overuse.," *Crit. Care Med.*, vol. 35, no. 2, pp. 379–85; quizz 386, Mar. 2007.
- [46] J. Rello, D. A. Ollendorf, G. Oster, M. Vera-Llonch, L. Bellm, R. Redman, and M. H. Kollef, "Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database.," *Chest*, vol. 122, no. 6, pp. 2115–21, Dec. 2002.
- [47] C. H. Marquette, M. C. Copin, F. Wallet, R. Neviere, F. Saulnier, D. Mathieu, A. Durocher, P. Ramon, and A. B. Tonnel, "Diagnostic tests for pneumonia in ventilated patients: prospective evaluation of diagnostic accuracy using histology as a diagnostic gold standard.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 151, no. 6, pp. 1878–88, Jun. 1995.

- [48] J. Vallés, A. Pobo, O. García-Esquirol, D. Mariscal, J. Real, and R. Fernández, “Excess ICU mortality attributable to ventilator-associated pneumonia: the role of early vs late onset.,” *Intensive Care Med.*, vol. 33, no. 8, pp. 1363–8, Aug. 2007.
- [49] M. H. Kollef, “Ventilator-associated pneumonia. A multivariate analysis.,” *JAMA*, vol. 270, no. 16, pp. 1965–70, Oct. 1993.
- [50] J.-Y. Fagon, “Nosocomial Pneumonia and Mortality Among Patients in Intensive Care Units,” *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, vol. 275, no. 11, p. 866, Mar. 1996.
- [51] A. Tejada Artigas, S. Bello Dronda, E. Chacón Vallés, J. Muñoz Marco, M. C. Villuendas Usón, P. Figueras, F. J. Suarez, and A. Hernández, “Risk factors for nosocomial pneumonia in critically ill trauma patients.,” *Crit. Care Med.*, vol. 29, no. 2, pp. 304–9, Mar. 2001.
- [52] D. K. Heyland, D. J. Cook, L. Griffith, S. P. Keenan, and C. Brun-Buisson, “The attributable morbidity and mortality of ventilator-associated pneumonia in the critically ill patient. The Canadian Critical Trials Group.,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 159, no. 4 Pt 1, pp. 1249–56, Apr. 1999.
- [53] N. Bercault and T. Boulain, “Mortality rate attributable to ventilator-associated nosocomial pneumonia in an adult intensive care unit: a prospective case-control study.,” *Crit. Care Med.*, vol. 29, no. 12, pp. 2303–9, Dec. 2001.
- [54] R. Celis, A. Torres, J. M. Gatell, M. Almela, R. Rodríguez-Roisin, and A. Agustí-Vidal, “Nosocomial pneumonia. A multivariate analysis of risk and prognosis.,” *Chest*, vol. 93, no. 2, pp. 318–24, Mar. 1988.
- [55] A. Villalobos, L. Barrero, S. Rivera, M. Ovalle, and D. Valera, “Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud , resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad , Colombia , 2011,” *Biomédica Rev. del Inst. Nac. Salud*, vol. 34, no. Supl 1, pp. 67–80, 2014.
- [56] Dirección de Salud Pública, “Criterios Diagnósticos de Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud a ser utilizados para la notificación al subsistema de vigilancia epidemiológica de IACS en Bogotá D.C,” pp. 2–76, 2010.
- [57] C. A. Moreno, V. D. Rosenthal, N. Olarte, W. V. Gomez, O. Sussmann, J. G. Agudelo, C. Rojas, L. Osorio, C. Linares, A. Valderrama, P. G. Mercado, P. H. A. Bernate, G. R. Vergara, A. M. Pertuz, B. E. Mojica, M. del P. T. Navarrete, A. S. A. Romero, and D. Henriquez, “Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of 9 Colombian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium.,” *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 27, no. 4, pp. 349–56, Apr. 2006.
- [58] G. Ortiz, N. Fonseca, F. Molina, M. Garay, A. Lara, and C. Dueñas, “Epidemiología de la neumonía asociada a ventilador en 39 unidades de cuidados intensivos de Colombia ( 2007-2009 ). Informe año 2010,” *Grup. Nac. Vigil. Epidemiol.*, vol. 11, no. 1, pp. 12–19, 2011.
- [59] Red Nacional de la Vigilancia de la resistencia Bacteriana y de las Infecciones Asociadas al Cuidado de la salud and (Colombia), “Estado Del Arte De La Resistencia Bacteriana Y La Vigilancia Epidemiológica De Las Infecciones Asociadas Al Cuidado De La Salud En Colombia,” pp. 1–31, 2010.
- [60] R. McEachern and G. D. Campbell, “Hospital-acquired pneumonia: epidemiology, etiology, and treatment.,” *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 12, no. 3, pp. 761–79, x, Sep. 1998.
- [61] D. L. George, “Epidemiology of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients.,” *Clin. Chest Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 29–44, Mar. 1995.

- [62] J. M. Boyce, G. Potter-Bynoe, L. Dziobek, and S. L. Solomon, "Nosocomial pneumonia in Medicare patients. Hospital costs and reimbursement patterns under the prospective payment system.," *Arch. Intern. Med.*, vol. 151, no. 6, pp. 1109–14, Jun. 1991.
- [63] E. S. Dietrich, M. Demmler, G. Schulgen, K. Fekec, O. Mast, K. Pelz, and F. D. Daschner, "Nosocomial pneumonia: a cost-of-illness analysis.," *Infection*, vol. 30, no. 2, pp. 61–7, Apr. 2002.
- [64] J. Chastre and J.-Y. Fagon, "Ventilator-associated pneumonia.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 165, no. 7, pp. 867–903, Apr. 2002.
- [65] D. K. Warren, S. J. Shukla, M. A. Olsen, M. H. Kollef, C. S. Hollenbeak, M. J. Cox, M. M. Cohen, and V. J. Fraser, "Outcome and attributable cost of ventilator-associated pneumonia among intensive care unit patients in a suburban medical center.," *Crit. Care Med.*, vol. 31, no. 5, pp. 1312–7, May 2003.
- [66] N. Safdar, C. Dezfulian, H. R. Collard, and S. Saint, "Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review.," *Crit. Care Med.*, vol. 33, no. 10, pp. 2184–93, Oct. 2005.
- [67] A. M. Baker, J. W. Meredith, and E. F. Haponik, "Pneumonia in intubated trauma patients. Microbiology and outcomes.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 153, no. 1, pp. 343–9, Jan. 1996.
- [68] L. Papazian, F. Bregeon, X. Thirion, R. Gregoire, P. Saux, J. P. Denis, G. Perin, J. Charrel, J. F. Dumon, J. P. Affray, and F. Gouin, "Effect of ventilator-associated pneumonia on mortality and morbidity.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 154, no. 1, pp. 91–7, Jul. 1996.
- [69] A. F. Shorr and P. G. O'Malley, "Continuous subglottic suctioning for the prevention of ventilator-associated pneumonia : potential economic implications.," *Chest*, vol. 119, no. 1, pp. 228–35, Jan. 2001.
- [70] C. S. Cocanour, L. Ostrosky-Zeichner, M. Peninger, D. Garbade, T. Tidemann, B. D. Domonoske, T. Li, S. J. Allen, and K. M. Luther, "Cost of a ventilator-associated pneumonia in a shock trauma intensive care unit.," *Surg. Infect. (Larchmt.)*, vol. 6, no. 1, pp. 65–72, Jan. 2005.
- [71] A. García, N. Fonseca, N. Giraldo, B. Gil, A. Pamplona, and A. Diaz, "Hospital direct costs of ventilator-associated pneumonia," *Acta Medica Colomb.*, vol. 39, no. 3, pp. 238–243, 2014.
- [72] J. Kuczynski, C. L. Lauber, W. a. Walters, L. W. Parfrey, J. C. Clemente, D. Gevers, and R. Knight, "Experimental and analytical tools for studying the human microbiome," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 1, pp. 47–58, 2011.
- [73] G. A. O'Toole and R. Kolter, "Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis.," *Mol. Microbiol.*, vol. 28, no. 3, pp. 449–61, May 1998.
- [74] A. V. Suescún, J. R. Cubillos, and M. M. Zambrano, "Genes involved in fimbrial biogenesis affect biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*," *Biomédica*, vol. 26, no. 4, pp. 528–537, 2006.
- [75] P. Knezevic and O. Petrovic, "A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm.," *J. Microbiol. Methods*, vol. 74, no. 2–3, pp. 114–8, Aug. 2008.
- [76] J. J. Harrison, C. A. Stremick, R. J. Turner, N. D. Allan, M. E. Olson, and H. Ceri, "Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized

- biofilm model for high-throughput screening.,” *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 7, pp. 1236–54, Jul. 2010.
- [77] S. Singla, K. Harjai, and S. Chhibber, “Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics.,” *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 66, no. 2, pp. 61–6, Mar. 2013.
- [78] Milena S, Vargas R. INFORME DE EVENTO INFECCIONES ASOCIADAS A DISPOSITIVOS EN UNIDADES DE CUIDADO INTENSIVO, COLOMBIA, 2017. Inst Nac salud. 2017;1–14.
- [79] Leal AL, Álvarez CA. Boletín informativo GREBO 2017. 2017;(2027):24.
- [80] World Health Organization (Who). Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. WHO Libr Cat Data. 2011;40.
- [81] Feng G, Cheng Y, Wang SY, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI. Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: How small is small enough? *npj Biofilms Microbiomes* [Internet]. 2015;1(August). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.22>
- [82] Bauer TT, Torres A, Ferrer R, Heyer CM, Schultze-Werninghaus G, Rasche K. Biofilm formation in endotracheal tubes. Association between pneumonia and the persistence of pathogens. *Monaldi Arch Chest Dis - Pulm Ser.* 2002;57(1):84–7.
- [83] Rodríguez EC, Saavedra SY, Leal AL, Álvarez C, Olarte N, Valderrama A, et al. Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomédica* [Internet]. 2014;34:224–31. Available from: [/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=&lang=pt](/scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lang=pt)
- [84] Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis.* 2016;63(5):e61–111.
- [85] Álvarez C, Rosenthal VD, Olarte N, Gomez WV, Sussmann O, Agudelo JG, et al. Device-Associated Infection Rate and Mortality in Intensive Care Units of 9 Colombian Hospitals: Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016;27(May):349–56.
- [86] Vandecandelaere I, Matthijs N, van Nieuwerburgh F, Deforce D, Vosters P, de Bus L, et al. Assessment of microbial diversity in biofilms recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches. *PLoS One.* 2012;7(6):11–4.
- [87] De Souza PR, De Andrade D, Cabral DB, Watanabe E. Endotracheal tube biofilm and ventilator-associated pneumonia with mechanical ventilation. *Microsc Res Tech.* 2014;77(4):305–12.
- [88] Pneumatikos IA, Dragoumanis CK, Bouros DE. Ventilator-associated pneumonia or endotracheal tube-associated pneumonia?: An approach to the pathogenesis and preventive strategies emphasizing the importance of endotracheal tube. *Anesthesiology.* 2009;110(3):673–80.
- [89] Ding C, Zhang Y, Yang Z, Wang J, Jin A, Wang W, et al. Incidence, temporal trend and factors associated with ventilator-associated pneumonia in mainland China: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1–10.
- [90] Tsai WH, Hsu HC, Shih CH. Increased risks of endotracheal tube cuff colonization after prolonged intubation. *Chin J Physiol.* 2014;57(3):152–7.
- [91] Hotterbeekx A, Xavier BB, Bielen K, Lammens C, Moons P, Schepens T, et al. The endotracheal tube microbiome associated with *Pseudomonas aeruginosa* or

*Staphylococcus epidermidis*. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(November):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep36507>