



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Impacto de la multirresistencia en la patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*: perspectiva epidemiológica-clínica y experimental

Silvia Gómez-Zorrilla Martín



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Impacto de la multirresistencia en la
patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*:
perspectiva epidemiológica-clínica y experimental**

Memoria presentada por

Silvia Gómez-Zorrilla Martín

para optar al título de Doctor/a en Medicina

Dirigida por:

Dra. Carmen Peña Miralles

Dr. Javier Ariza Cardenal

Programa de doctorado Medicina

Universitat de Barcelona

2015-2016



Health Universitat de
Barcelona
Campus

B:KC Barcelona
Knowledge
Campus
Campus de Excelencia Internacional



UNIVERSITAT DE BARCELONA

La **Dra. Carmen Peña Miralles**, facultativo especialista del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Bellvitge y el **Dr. Javier Ariza Cardenal**, Catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, hacen constar que la tesis titulada:

"Impacto de la multirresistencia en la patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*: perspectiva epidemiológica-clínica y experimental"

que presenta la licenciada **Silvia Gómez-Zorrilla Martín**, ha sido realizada bajo su dirección en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Bellvitge, en el marco del Programa de Doctorado de "Medicina" de la Universidad de Barcelona. La consideran finalizada y autorizan su presentación para que sea defendida ante el tribunal que corresponda.

En Barcelona, a 28 de septiembre del 2016.

Dra. Carmen Peña Miralles

Dr. Javier Ariza Cardenal.

A mis padres

A Javi

Al pequeño Aitor

**Por todo vuestro cariño, apoyo y comprensión,
sin vosotros, no hubiera sido posible.**

Hay cosas que nunca desaparecerán,
están en la carne, hablan, están en la tierra...
Están en la tierra,
montones de piedras apiladas una a una,
con las manos de los padres, de los abuelos...

Toda su paciencia acumulada resistió a la lluvia, al horizonte;
haciendo pequeños montoncitos ante la noche,
para retener la luz de la luna, para estar erguidos,
para inventar montañas y jugar con el trineo,
y creer que tocamos las estrellas.

Se lo contaremos a nuestros hijos,
les diremos que fue duro,
pero que nuestros padres fueron unos señores
y que heredamos eso de ellos,
montones de piedras y el coraje para levantarlas.

Hoy empieza todo
(Bertrand Tavernier)

Sin duda, estas son las hojas más difíciles de escribir de toda la tesis... porque hay mucho que agradecer y pocas palabras que sean lo suficientemente adecuadas para expresar todos mis sentimientos. Realmente, hubiera sido muy difícil afrontar el enorme esfuerzo intelectual y emocional que la investigación doctoral requiere, si no hubiera sido por el gran apoyo que he encontrado tanto dentro como fuera del hospital. Es imposible nombrar a todos los compañeros, amigos y familia que habéis contribuido... Vayan sólo algunos de los nombres.

En primer lugar, querría agradecer a **Carmen Peña**, directora de la tesis, por toda su implicación, porque me es imposible imaginar una directora de tesis mejor. Gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo durante todos estos años; confieso que para mí las "*Pseudomonas*" fueron la excusa para poder trabajar al lado de una doctora a la que admiraba (y admiro) e intentar aprender al máximo de su forma de hacer Medicina. Gracias por enseñarme que el sentido común es la mejor arma de la que disponemos los médicos. Gracias por contagiarme tu ilusión y tus ganas de hacer bien las cosas, por estar siempre dispuesta, por tu dedicación con los pacientes y por tu espíritu docente... Hace un año y medio casi de forma simultánea que las dos, cada una a su manera, empezamos una etapa nueva en nuestra vida... Tú hiciste las maletas para volver a tus orígenes y yo me estrené como madre... Este año y medio, que hemos compartido en la distancia, ha sido intensísimo para las dos... pero aún así hemos conseguido que la tesis saliera adelante... Y tú no tenías ninguna obligación de seguir en este barco... Gracias por decidir no abandonar, ¡al final hemos llegado a buen puerto!.

Al **Dr. Javier Ariza**, co-director de esta tesis, ejemplo de compromiso, siempre accesible y dispuesto a prestar su ayuda. Por todas tus enseñanzas durante estos años, por tus reflexiones, tu sentido crítico y rigor científico... y por tu amor por la Medicina. Por contribuir a mi formación y maduración tanto a nivel médico-académico como personal... Gracias por tu cuidadosa lectura de esta tesis, tus anotaciones y valiosos consejos para mejorarla.

A mi familia. No sólo es que este trabajo no hubiera sido posible sin ellos; sino que yo misma tal y como soy no hubiera sido posible. El máximo reconocimiento y gratitud a mis padres, por ser como son y por haberme dado todas las herramientas para que pudiera llegar a donde he llegado. A **mi madre**, por su amor incondicional y por insistir siempre en que lo más importante de todo (más que cualquier título o carrera) es que seamos buenas personas. A **mi padre**, por su perseverancia, por su inagotable interés por aprender cosas nuevas de cualquier

campo del conocimiento... y por contagiarme esa curiosidad por aprender. A los dos, por la ilusión con la que los dos os habéis leído la tesis y por el esfuerzo que habéis hecho por entenderla a pesar de *“las palabras raras”* que usamos los médicos... A mi hermana **Ana**, porque nunca te digo lo importante que eres para mí, lo mucho que te quiero y lo orgullosa que estoy de tenerte como hermana mayor.

A **Javi**, por ser la persona que más ha sufrido esta tesis, porque nadie como tú ha tenido que aguantar los cambios de humor y las crisis emocionales que una tesis conlleva, principalmente en las últimas semanas. Gracias por darme ánimos cada vez que me venía abajo, por encontrar palabras para hacerme sentir mejor y para que siguiera adelante... Gracias por aguantar mis *“Este fin de semana no puedo...porque tengo guardia, exámenes de estadística o historia o el deadline de un congreso”*... Gracias por ayudarme cada vez que el ordenador me hacía sabotaje o por la cantidad de rollos que te has tragado sobre *“Pseudomonas resistentes y super-extra-mega-resistentes”*... Gracias por aguantar mis agobios y mis inseguridades... Pero sobretodo, gracias por estar a mi lado día a día y por quererme como soy, a pesar de todo.

A **Aitor**, por dar una nueva luz a mi vida y llenarla de alegría, porque eres el mejor regalo del mundo, por hacerme mejor persona, por darme serenidad, por enseñarme a relativizar los problemas y por hacerme redescubrir el encanto de las pequeñas cosas... Gracias por tu sonrisa y tus besos que me han dado fuerzas cuando ya no me quedaban... Gracias por hacer que esta ardua fase de redacción de la tesis haya sido a la vez una etapa muy emocionante de mi vida.

Tengo la suerte de haber trabajado con un **Equipazo de Microbióloga**, que no sólo han permitido que los trabajos de este proyecto salieran adelante, sino que me han enseñado muchísimo del mundo de las *Pseudomonas* y de las *“no Pseudomonas”*. A **Fe Tubau, Maria Angeles Domínguez y Mariana Camoez**, gracias por encontrar siempre un hueco en vuestra colmada agenda y hacerlo todo tan fácil. Gracias también a **Laura Calatuyud** por enseñarme a hacer serologías y ELISAs. Mi sincero agradecimiento también para **Joel y Mercedes**, porque a pesar de todo el trabajo extra que supuso la realización del estudio epidemiológico siempre me recibisteis con la mejor de vuestras sonrisas y me tratasteis con un inmerecido cariño. Al resto de **Servicio de Microbiología**, por acogerme siempre tan bien, porque realmente habéis hecho durante el tiempo (muchísimo) que he pasado en vuestro servicio me sintiera como en casa... ¡Gracias por hacerme un hueco en vuestras más que ocupada poyatas!.

Al equipo del **Servicio de Microbiología del Hospital de Son Espases** de Palma de Mallorca, muy especialmente a **Antonio Oliver**, por todo lo que he aprendido de él, por la celeridad con la que siempre has contestado mis mails llenos de dudas...

A todos los miembros del **Servicio de Enfermedades Infecciosas**, de los que nunca he dejado de aprender y porque todos habéis influido de alguna manera en mi formación. A **Inma Grau**, fuente inagotable de conocimientos, atípica y maravillosa combinación de brillantez y humildad extrema... Todo un lujo poder haber comentado y discutido “*en petit comité*” pacientes contigo; muchísimas gracias por todo lo que me has enseñado. A **Nuria Sabé**, por su generosidad y dedicación, por estar siempre dispuesta a ayudar con su dulce sonrisa... A **Oscar Murillo**, por su complicidad y amistad. A todo el Servicio sin excepción, gracias de verdad: **Dr. Francisco Gudiol, Jordi Carratalà, Miguel Santín, Carmen Cabellos, Miquel Pujol, Dani Podzamczar, Elena Ferrer, Arkaitz Imaz, Eva Van Den Eynde, María Saumoy, Carlota Gudiol, Carol García-Vidal, Dr. Pedro Fernández Viladrich ...** Al **Dr. Román Pallarés**, por su orientación en el análisis de los estudios epidemiológicos. A **Evelyn Shaw** por ponerme al día de la situación epidemiológica de la UCI durante mis meses de ausencia. A **Cris Suárez**, porque con tu trabajo construiste las bases para que el resto fuera mucho más fluido...

A **Jaime Lora-Tamayo**, por adoptarme como “R pequeña” cuando aterricé en Barcelona y seguir ejerciendo a pesar de la distancia. Gracias por tu entusiasmo inagotable, por tu infinita paciencia (sobre todo conmigo), por preocuparte tanto por mí y por estar siempre disponible a escucharme y ayudarme. Enormemente agradecida por todo el soporte estadístico que me has dado tanto en Bellvitge como después desde Madrid.

A los otros becarios con los que he compartido estos años, que son amigos y maestros: **Oriol Gasch** (un honor heredar tu mesa); **Iván Pelgrín, Marta Bodro y Laura Muñoz** (el camino ha sido duro pero mereció la pena, ¡viva los epsilonles!). **Antonella Simonetti y Alba Ribera**, con las que inicié mi formación; chicas se me hace muy raro pensar que después de tantos años nuestros caminos se separan. A **Francesca Gili, Isa Oriol, Guille...**

A **Isabel**, del servicio de limpieza, toda una suerte conocerte, gracias por tu contagiante alegría y por nuestras conversaciones de primera hora de la mañana en las que intentábamos cambiar el mundo.... A todo el equipo de **enfermería de la 12.1**, por lo bien que trabajáis... ¡¡y lo bien que se está trabajando con vosotras!!.. A las secres, **Patri y Bego**, por ayudarme y escucharme...

A todos los médicos del **Servicio de Medicina Interna** de Bellvitge, de los que tanto he aprendido, con un agradecimiento muy especial a **Maruja Pac, Antonio Vidaller, Olga Capdevila, Toni Riera y Ramón Pujol**.

A todos los médicos y enfermeras de la UCI, por ayudarme a la realización del estudio, con un especial agradecimiento a la **Dra. Rosario Cañizares y Elisabet Periche**, porque fue todo un lujo poder trabajar directamente con vosotras. También a **Dr. Plácido Rodríguez y Dr. Ton Ricart**, por todas sus enseñanzas durante el tiempo que estuve realizando el estudio en la UCI. A **Fran Morandeira** del Servicio de Inmunología y a **María José Castro** del Servicio de Bioquímica. A **Cristian Tebé**, por su asesoramiento estadístico y ayudarme a superar las “preguntas de los revisores”.

Al personal del **Estabulario del Campus de Bellvitge**, especialmente a **Pilar Pastor** por ser la que me enseñó a coger los ratones y a superar mis miedos a ser mordida por ellos. A **Pedro**, por estar siempre pendiente de que estuviera todo en orden. A **Álvaro Giménez**, por revisar y perfeccionar el protocolo del procedimiento.

A **Cristina el Haj**, del Laboratorio de Infección Experimental, por su agradable compañía durante los laaaaaargos días de experimentos.

A **Menia Pachón**, porque sin tu ayuda yo hubiera sido capaz de llevar a cabo el modelo experimental... ¡¡Gracias, gracias y mil veces gracias!!; por la calidez con la que me acogiste los días que estuve en Sevilla, todo lo que me enseñaste y por el gran apoyo que me diste posteriormente en la distancia, estando SIEMPRE dispuesta a contestar las dudas de esta clínica metida en el mundo experimental.

A mis compañeros del **Hospital Sant Camils**, en especial a la **Dra. Helena Camel**, por todas las facilidades que me ha dado en este último año para poder compaginar el trabajo asistencial con la realización de esta tesis doctoral, y también, con la conciliación familiar.

Por último, quiero mencionar a otras personas muy importantes en mi vida, que a su manera también han contribuido a esta tesis... Digamos que hay personas, que te conocen desde que tienes cuatro años y te quieren de verdad; que te acompañan en tus proyectos vitales, confían en ti y te animan a llevar adelante tus retos... Sólo la gente que nos conoce sabe del tesoro del que hablo y que no existen palabras para describir nuestra amistad... A **Laura Donadeo, Marta Sáenz y Amanda López**, porque en el fondo sois un poco responsables de todo esto. Y aunque os quiero a las tres por igual, es justo hacer un agradecimiento especial a Laura Donadeo o la bibliotecaria más eficiente del mundo, por conseguirme durante todos estos años en un tiempo record esos "*artículos científicos que necesitas y no encuentras en ningún sitio*" y por ayudarme a que el apartado de bibliografía quedara "*niquelao*".

A mis preciosísimas sobrinas, **Gabriela y Martina**, porque cada vez que os veo me invade una alegría infinita y cuando no puedo veros pero me acuerdo de vosotras se me dibuja en la cara una sonrisa enorme y ¡me entran unas ganas enormes de coger un tren para ir a achucharos!.

A mis compañeros y grandísimos amigos de la facultad de Medicina de la Complutense de Madrid **Ana García, Krusty, Boss, Chío, Michel, Chuso, Laura** ... por hacer tan especiales esos primeros años de contacto la Medicina, por todos los momentos de felicidad inolvidable que hemos compartido y que seguiremos compartiendo.

A **Sachiko**, mi hermana japonesa. A **Samu**, matemático-filósofo y ejemplo de integridad intelectual... da igual si no podemos vernos durante siglos que la conversación siempre es cercana y agradable. A mis compañeros de piso durante los primeros años de vida en Barcelona, en especial a **Oscar de la Torre** (yo era la "*empo*" pero al final tú te doctoraste antes ¿eh?), a **Gon, Victor y Gian Marco**; por ser mi pequeña familia durante esos primeros años y por aguantar mis "torpezas" saliente de guardia... A todo el personal de la Escola Municipal Bressol "El Palomar", especialmente a **María**, por su dedicación y profesionalidad; por la tranquilidad que me dabais al saber que dejaba a mi pequeñajo en tan buenas manos, porque sin esa confianza, yo no hubiera encontrado la serenidad necesaria para redactar esta tesis doctoral. A un grupo muy, pero que muy especial de "Mamisssss (**Mari, Montse, Irene, Estefanía, Germania, Gala, Isa y Marta**) por la fortaleza y el apoyo emocional que me habéis dado en este último año y medio.

Y por último, a aquellos que tengáis esta tesis en las manos, gracias por dedicar parte de vuestro tiempo en ella... espero que os pueda ser útil.

La investigación presentada en esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda de:

) **Fondo de Investigación Sanitaria: Beca FIS PI11/00164.**

Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad- cofinanciado por los Fondos Europeos de Desarrollo Regional FEDER (“A way to build Europe”).

) **Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD12/0015).**

Financiación del Plan Nacional de I+D+i y el Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, - cofinanciada por los Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER (“ A way to build Europe”).

PRESENTACIÓN

La sobreutilización de los antibióticos ocurrida en las últimas décadas ha contribuido a generar un rápido incremento de la resistencia bacteriana, mediante un mecanismo de presión antibiótica selectiva y el desarrollo mutaciones que hace a las bacterias resistentes a los antibióticos. *Pseudomonas aeruginosa* es una de las principales bacterias responsables de las infecciones en el medio hospitalario y una de las que tiene mayor capacidad de desarrollar resistencia a los antibióticos disponibles.

El hiperconsumo generalizado de los antibióticos se ha producido tanto en el ámbito de la medicina como en el de la veterinaria. En la práctica clínica los médicos no suelen escatimar el uso de antibióticos, en ocasiones con dudosa indicación, para proporcionar una “falsa seguridad” a sus pacientes; sin tener en cuenta sus innecesarios efectos secundarios y las importantes repercusiones sobre el conjunto de la población, al favorecer un entorno en el que las bacterias evolucionan más rápidamente a la creación de resistencias. En el ámbito de la ganadería, la contribución al problema es de igual o mayor importancia, al ser utilizados los antibióticos a dosis subterapéuticas en los piensos de los animales para estimular su crecimiento, lo que comporta grandes implicaciones sociales y económicas.

Los antibióticos son un bien colectivo que debemos proteger, ya que de su buen uso depende su efectividad. Ello es particularmente así, ya que la rápida evolución ecológica de las bacterias, contrasta con una gran parálisis en el proceso de desarrollo de nuevos antimicrobianos, con lo que el margen terapéutico para tratar infecciones multirresistentes es muy reducido. Es nuestra responsabilidad utilizar los antibióticos de forma racional.

En este contexto se desarrolla el presente trabajo, en el que se intenta evaluar desde una perspectiva global, clínica y experimental, el posible coste biológico que puede suponer para *P. aeruginosa* la adquisición de multirresistencia y responder a preguntas como: ¿es la adquisición de mecanismos de resistencia un proceso gratuito para la bacteria o le supone un coste?; ¿mantienen las cepas multirresistentes la misma patogenicidad y virulencia que las sensibles?, o dicho de otra forma, ¿son igual de capaces de producir enfermedad y con la misma agresividad que las cepas sensibles?.

Nuestra hipótesis fue que la adquisición de resistencias supone un “gasto de energía” o un coste biológico para la bacteria y que éste motiva una disminución de su virulencia y de sus efectos deletéreos para el huésped. Con ello podría justificarse un uso más selectivo de las antibioterapias empíricas y diseñar políticas antibióticas más específicas en las que los fármacos de última línea se reserven para determinados grupos de riesgo. Nuestros resultados sugieren que las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente producen una colonización más tardía y sufren un coste biológico, manifestado con una menor invasividad, capacidad de producir respuesta inflamatoria y mortalidad atribuible. Ello permite considerar un mayor margen en el abordaje empírico de estas situaciones clínicas y una utilización más ajustada de la antibioterapia.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones en revistas científicas indexadas.

1. Peña C, **Gómez-Zorrilla S**, Suárez C, Domínguez MA, Tubau F, Arch O, Oliver A, Pujol M, Ariza J. Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk of blood stream infection in hospitalized patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Oct;31(10):2791–7. Impact factor: 2.857
2. Peña C, **Gómez-Zorrilla S**, Oriol I, Tubau F, Domínguez MA, Pujol M, Ariza, J. Impact of multidrug resistance on *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia outcome: predictors of early and crude mortality. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Mar;32(3):413–20. Impact factor: 2.857
3. **Gómez-Zorrilla S**, Camoez M, Tubau F, Periche E, Cañizares R, Domínguez MA, Ariza J, Peña C. Antibiotic pressure is a major risk factor for rectal colonization by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Oct;58(10):5863–70. Impact factor: 4.476
4. **Gómez-Zorrilla S**, Camoez M, Tubau F, Cañizares R, Periche E, Domínguez MA, Ariza J, Peña C. Prospective observational study of prior rectal colonization status as a predictor for subsequent development of *Pseudomonas aeruginosa* clinical infections. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Sep;59(9):5213–9. Impact factor: 4.476
5. Peña C, Cabot G, **Gómez-Zorrilla S**, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Clin Infect Dis. 2015 Feb 15;60(4):539–48. Impact factor: 8.736

6. **Gómez-Zorrilla S**, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F, Oliver A, Ariza J, Peña C. Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: *in vitro* and *in vivo* studies. Int J Antimicrob Agents. 2016 May;47(5):368–74. Impact factor: 4.097
7. **Gómez-Zorrilla S**, Morandeira F, Catro MJ, Tubau F, Periche E, Cañizares R, Domínguez MA, Ariza J, Peña C. Acute inflammatory response of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infections: a prospective study. Microb Drug Resist. 2016 Oct 18 [Epub ahead of print]. Impact factor: 2. 529
8. **Gómez-Zorrilla S**, Calatayud L, Juan C, Cabot G, Tubau F, Oliver A, Domínguez MA, Ariza J, Peña C. Understanding the acute inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infections: differences between susceptible and multidrug-resistant strains in a mouse peritonitis model. Aceptado el 3 de octubre del 2016 para publicación en la revista International Journal of Antimicrobial Agents. Impact factor: 4.097

Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.

1. Millat P, **Gómez-Zorrilla S**, Suárez C, Tubau F, Pujol M, Ariza J, Peña C. Bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*: influencia de la sensibilidad a la Piperacilina-Tazobactam en el pronóstico. XV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, España; 1-4 de junio del 2011. Comunicación 468.
2. **Gómez-Zorrilla S**, Peña C, Oriol I, Suárez C, Domínguez MA, Tubau F, Arch O, Oliver A, Pujol M, Ariza J. Invasividad de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* extremadamente resistentes: capacidad de producir bacteriemia. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao, España; 9-12 de mayo del 2012. Comunicación 541.

3. **Gómez-Zorrilla S**, Peña C, Cañizares R, Periche E, Tubau F, Domínguez MA, Ariza J. Impacto de la multirresistencia antibiótica en la respuesta inflamatoria clínica de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Zaragoza, España; 29-31 de mayo del 2013. Comunicación 619.
4. **Gómez-Zorrilla S**, Peña C, Morandeira F, Castro M, Periche E, Cañizares R, Tubau F, Domínguez MA, Ariza J. Molecular inflammatory responses of patients with Multidrug-resistant (MDR) and non-MDR *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infections. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2013) Denver, Colorado, Estados Unidos; 10-13 de septiembre 2013. Comunicación K-180.
5. **Gómez-Zorrilla S**, Peña C, Tubau F, Camoez M, Periche E, Cañizares R, Domínguez MA, Ariza J. Dinámica de colonización rectal por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (MDR) y extremadamente resistente (XDR). Impacto del consumo de antibióticos. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Valencia, España; 9-11 de abril del 2014. Comunicación 063.
6. Tubau F, Camoez M, **Gómez-Zorrilla S**, Peña C, Ardanuy C, Domínguez MA. Evolución de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo-betalactamasa (MLB) en un hospital de tercer nivel. Epidemiología y caracterización molecular. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Valencia, España; 9-11 de abril del 2014. Comunicación 025.
7. **Gómez-Zorrilla S**, Camoez M, Tubau F, Cañizares R, Periche E, Domínguez MA, Ariza J, Peña C. Clinical invasiveness on patients with Multidrug-Resistant (MDR) and non-MDR *Pseudomonas aeruginosa* (PA) colonization. 54th Interscience Conference on

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2014). Washington, D.C., Estados Unidos; 5-9 de septiembre del 2014. Comunicación K-1047.

8. **Gómez-Zorrilla S**, Tubau F, Camoez M, El Haj C, Vivas M, Murillo O, Ariza J, Peña C. Impact of multidrug resistance on virulence of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in an experimental mice peritonitis model. 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2014). Washington, D.C., Estados Unidos; 5-9 de septiembre del 2014. Comunicación E-231.
9. Camoez M, Tubau F, Domínguez MA, **Gómez-Zorrilla S**, Peña C, Ardanuy C. Molecular characterization of the two major clones of methallo-B-lactamases (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in a Spanish hospital. 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2014). Washington, D.C., Estados Unidos; 5-9 de septiembre del 2014. Comunicación C-093.
10. **Gómez-Zorrilla S**, Juan C, Cabot G, Calatayud L, Tubau F, Oliver A, Domínguez MA, Ariza J, Peña C. Impacto de la multirresistencia en la patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa* en un modelo experimental *in vivo* e *in vitro*. X Jornadas Científicas de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa. Sevilla, España; 28-29 abril del 2016.
11. **Gómez-Zorrilla S**, Calatayud L, Juan C, Cabot G, Grillo S, Tubau F, Oliver A, Domínguez MA, Ariza J, Peña C. Impacto de la multirresistencia en la respuesta inflamatoria a la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en un modelo experimental *in vivo*. XX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Barcelona, España; 26-28 de mayo del 2016. Comunicación 371.

ÍNDICE

)	PRESENTACIÓN	1
)	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	5
)	SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	17
)	INTRODUCCIÓN	21
	1. Características microbiológicas de <i>P. aeruginosa</i>	
	1.1. Aspectos generales.....	23
	1.1.1. Taxonomía. Características bioquímicas, fisiológicas y patogénicas	23
	1.1.2. Estructura bacteriana	25
	1.2. Principales determinantes microbiológicos de patogenicidad y virulencia	27
	1.2.1. Factores de virulencia de infección invasiva aguda por <i>P. aeruginosa</i> ...	27
	1.2.2. Factores de virulencia de infección crónica por <i>P. aeruginosa</i>	32
	1.3. Mecanismos de resistencia antibiótica en <i>P. aeruginosa</i>	34
	1.3.1. Resistencia intrínseca	34
	1.3.2. Resistencia adquirida	37
	2. Epidemiología de <i>P. aeruginosa</i>.	
	2.1. Colonización e infección por <i>P. aeruginosa</i>	41
	2.2. Epidemiología de la multirresistencia en <i>P. aeruginosa</i>	44
	2.2.1. Multirresistencia: Situación actual y gravedad del problema.....	44
	2.2.2. Evolución de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente en el Hospital Universitari de Bellvitge: perspectiva històrica	45
	2.2.3. Clones epidémicos de alto riesgo (high-risk clones)	50
	3. Multirresistencia y Coste biológico	52
	4. Impacto clínico de la multirresistencia	54
	5. Respuesta inflamatoria a la infección	
	5.1. Sepsis y respuesta inflamatoria a la infección	56
	5.2. Interleuquinas y principales biomarcadores de infección	58
	5.3. Patogénesis de la infección por <i>P. aeruginosa</i> y respuesta inmune del huésped..	60
	6. Modelos animales de infección experimental	
	6.1. Utilidad y aplicaciones de los modelos de experimentación animal	61
	6.2. Aspectos éticos del uso de modelos de experimentación animal	63
	6.3. Modelo de infección experimental de peritonitis en ratón	64
	6.4. Justificación de uso del procedimiento de experimentación animal	65

B. Patogenicidad clínica de *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia antimicrobiana.

B1. Invasividad clínica o capacidad de producir infección.

Objetivo 4.	Evaluar la influencia de la multirresistencia en la capacidad de producir infección por <i>P. aeruginosa</i>	135
--------------------	--	-----

B2. Capacidad de producir respuesta inflamatoria.

Objetivo 5.	Analizar la respuesta inflamatoria clínica y molecular de pacientes con infección por <i>P. aeruginosa</i> en función del patrón de resistencia	141
--------------------	---	-----

B3. Letalidad.

Objetivo 6.	Estudiar el impacto de la multirresistencia de <i>P. aeruginosa</i> en el pronóstico de las neumonías asociadas a ventilación mecánica	147
--------------------	--	-----

Objetivo 7.	Investigar la influencia del genotipo de secreción tipo III (SSTT) y del patrón de resistencia en la mortalidad de las infecciones bacteriémicas por <i>P. aeruginosa</i>	153
--------------------	---	-----

C. Patogenicidad y virulencia *in vitro* de *P. aeruginosa* en función de su patrón de resistencia.

Objetivo 8.	Estudiar los principales determinantes de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> y evaluar su expresión en función del perfil de resistencia antibiótica	163
--------------------	--	-----

D. Patogenicidad y virulencia de *P. aeruginosa* en un modelo experimentación animal.

Objetivo 9.	Estudiar el impacto de la multirresistencia de <i>P. aeruginosa</i> en la capacidad de producir mortalidad en un modelo experimental animal	167
--------------------	---	-----

Objetivo 10.	Analizar el impacto de la multirresistencia de <i>P. aeruginosa</i> en la capacidad de producir enfermedad y respuesta inflamatoria en un modelo experimental animal	171
---------------------	--	-----

) DISCUSIÓN	177
1. Epidemiología de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.	
1.1. Dinámica de colonización intestinal por <i>P. aeruginosa</i> en pacientes críticos	179
1.2. Colonización intestinal como predictor del desarrollo de infección	181
1.3. Presión antibiótica como factor de riesgo fundamental para la colonización e infección por cepas de <i>P. aeruginosa</i> multirresistentes y extremadamente resistentes	183
2. Impacto de la resistencia antibiótica en la patogenicidad de <i>P. aeruginosa</i>.	
2.1. Multirresistencia y coste biológico en <i>P. aeruginosa</i> : estudios experimentales ..	187
2.2. Impacto clínico de la multirresistencia de <i>P. aeruginosa</i>	192
2.2.a. Capacidad de producir infección clínica	192
2.2.b. Capacidad de producir respuesta inflamatoria	195
2.2.c. Impacto de la resistencia antibiótica en el pronóstico del paciente	197
3. <i>P. aeruginosa</i> high-risk clones: Epidemiología y comportamiento de los principales clones epidémicos de <i>P. aeruginosa</i> multirresistente.	
3.1. Epidemiología de los high-risk clones de <i>P. aeruginosa</i> en nuestro medio	202
3.2. Comportamiento biológico y determinantes patogénicos de high-risk clones.....	205
) CONCLUSIONES	209
) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	215
) ANEXOS	239
ANEXO I. Artículos incluidos en la tesis	241
ANEXO II. Formularios de recogida de datos	305
II.a. Protocolo del estudio prospectivo (artículos 1,2 y 4).....	307
II.b. Protocolo recogida bacteriemias (artículos 3 y 6)	312
II.c. Protocolo recogida neumonía asociada a ventilación mecánica (artículo 5)	313
II.d. Protocolo del modelo animal (artículo 7 y 8).....	314
ANEXO III. Documentación de Comités Éticos	315

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
μl	microlitro (10 ⁻⁶ litros)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Aminoglucósidos
AME	Enzima modificador de aminoglucósidos
AMK	Amikacina
ATM	Aztreonam
BGN	Bacilos gram negativos
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CST	Colistina
ELISA	Ensayo por inmunosorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FEP	Cefepime
FOF	Fosfomicina
FQUIN	Fluoroquinolonas
GEN	Gentamicina
h	horas
IC	Intervalo de confianza
IL	Interleuquinas
IL-6	Interleuquina 6
IL-10	Interleuquina 10
IPM	Imipenem
IQR	Rango intercuartil
MBL	Metalo-beta-lactamasa

MDR	Multirresistente (<i>MultiDrug resistant</i>)
MDR no-XDR	Multirresistente no extremadamente resistente
MEM	Meropenem
min	minutos
ml	mililitros
MLST	Multilocus Sequence Typing
multiS	multisensible
NAV	Neumonía asociada a la ventilación mecánica
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina
PFGE	Electroforesis en campo pulsado (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
QRDR	Región determinante de la resistencia a quinolonas
SD	Desviación Estándar
SF	Suero Fisiológico
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SSTT	Sistema de secreción tipo III
TAV	Traqueobronquitis asociada a la ventilación mecánica
TIC	Ticarcilina
TNF-α	Factor de necrosis tisular-alfa
TOB	Tobramicina
TSB	Medio triptona de soja (<i>Tryptic Soy Broth</i>)
TZP	Piperacilina/tazobactam
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidad formadoras de colonias
XDR	Extremadamente resistente (<i>Extensively Drug Resistant</i>)

INTRODUCCIÓN

1. Características microbiológicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1. Aspectos generales.

1.1.1. Taxonomía. Características bioquímicas, fisiológicas y patogénicas.

Pseudomonas aeruginosa es el principal patógeno del género *Pseudomonas*, dentro de la familia *Pseudomonadaceae* [1]. Fue aislada por primera vez en muestras ambientales por Schroeter en 1872 [1]. Su nombre *aeruginous* ("color del cobre oxidado") refleja el característico color azul-verdoso de sus colonias que es debido a los pigmentos producidos por esta especie [2].

Figura 1. Colonias de *Pseudomonas aeruginosa*.

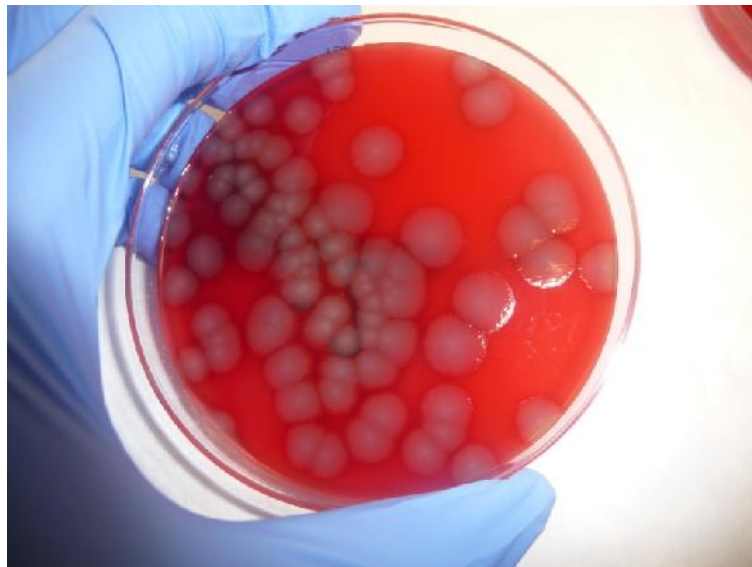


Figura 1. Crecimiento de *P. aeruginosa* en placa de agar sangre.

Es un bacilo gram negativo, aerobio, no formador de esporas y móvil. Es oxidasa y catalasa-positiva; no fermentador de la lactosa. Las colonias de *P. aeruginosa* presentan un olor característico a uva o fruta madura, debido a la producción de 2-aminocetofenona [2, 3].

En cultivo, *P. aeruginosa* crece tanto en medios enriquecidos como no enriquecidos; y, aunque su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 30-37°C, es capaz de multiplicarse y sobrevivir casi en cualquier ambiente. Se encuentra de forma ubicua en el medio, presentando predilección por los ambientes húmedos, típicamente en suelos y aguas, pero es capaz de vivir en diferentes hábitats. Es un patógeno natural para plantas y protozoos y puede comportarse como patógeno oportunista de animales [4].

A pesar de su potencial patogenicidad y de su presencia ubicua en el medio ambiente, *P. aeruginosa* se comporta como un **patógeno oportunista** que raramente produce enfermedad en individuos sanos [4]; pero que puede producir infecciones graves en pacientes con enfermedades subyacentes o inmunocomprometidos [4-7].

El éxito de *P. aeruginosa* como patógeno oportunista viene derivado de: 1) su gran versatilidad metabólica; 2) sus escasos requerimientos nutricionales y su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas; 3) su adaptabilidad genética; 4) su elevada capacidad de producir factores de virulencia; 5) su capacidad de formación de biofilm que permiten su permanencia estable a largo plazo y dificulta su erradicación; y 6) su resistencia intrínseca a gran número de antimicrobianos y capacidad de desarrollar resistencias adquiridas durante el curso de la infección [5, 8-9].

1.1.2. Estructura bacteriana.

Dentro de su estructura, cabe destacar la presencia de uno o varios **flagelos polares**, que confieren movilidad a la bacteria. Además, en los polos celulares presenta unas proyecciones filiformes, denominadas **pili o fimbrias**, que intervienen en la adherencia de la bacteria a las células del huésped.

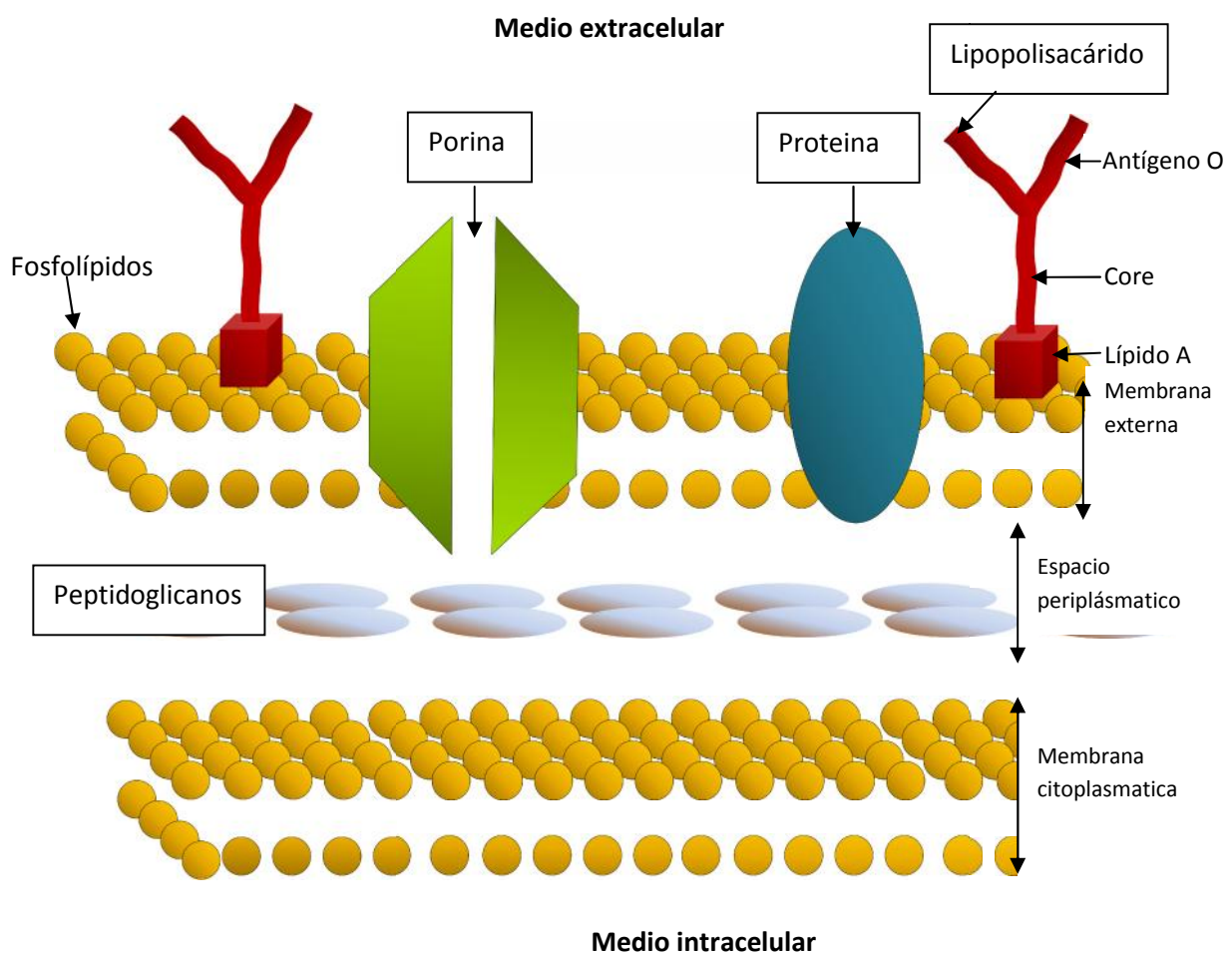
La envoltura celular de *P. aeruginosa* (**figura 2**) contribuye a su patogenicidad, ya que forma una capa poco permeable que evita la lisis osmótica, que protege a la bacteria de la entrada de sustancias tóxicas (incluyendo antibióticos) y que confiere resistencia frente los mecanismos de defensa del huésped. Tiene especial importancia en el desarrollo de resistencias a antimicrobianos, tanto por la baja permeabilidad de la membrana a los mismos como por la aparición de mecanismos de resistencia a este nivel. Esta envoltura celular está formada por:

-)] **Membrana citoplasmática o membrana interna**, compuesta por una bicapa lipídica con fosfolípidos que sirve de barrera osmótica y presenta permeabilidad selectiva.

-)] **Pared celular**: situada por fuera de la membrana citoplasmática constituida por un espacio periplasmático y una membrana externa, siendo esta última exclusiva de los bacilos gram negativos (BGN).
 - El **espacio periplasmático** consta de un esqueleto de peptidoglicanos que dan forma y rigidez a la bacteria, protegiéndola de la lisis osmótica.
 - La **membrana externa**, está formada por una doble capa con fosfolípidos y proteínas que se unen al esqueleto del peptidoglicanos del espacio periplasmático. Además, en la cara exterior de esta membrana externa se encuentran los lipopolisacáridos que son complejos glucolipídicos formados por

tres regiones: *Lipido A* o *endotoxina* (estímulo inmunológico que favorece la respuesta inflamatoria sistémica), el polisacárido central o *Core* (núcleo) y el *Antígeno O* (determinante antigénico cuya variabilidad permite que sea utilizado para la clasificación en serogrupos). La membrana externa presenta además unas proteínas transmembrana, denominadas porinas, que forman poros o canales relativamente inespecíficos, que permiten la entrada por difusión pasiva de moléculas hidrofílicas al interior de la célula, aumentando la permeabilidad de la membrana.

Figura 2. Estructura de la pared celular de *P. aeruginosa*.



1.2. Principales determinantes microbiológicos de patogenicidad y virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

La capacidad de *P. aeruginosa* para adaptarse y persistir en el medio, es debida en parte a la acumulación de un amplio número de determinantes de virulencia [4]. Estos factores no son expresados por igual en todos los momentos, existiendo diferencias entre los aislamientos de las infecciones invasivas agudas y los de las infecciones crónicas. En las primeras, producidas por bacterias planctónicas o bacterias en vida libre, predominan factores de virulencia mientras que en las infecciones crónicas estos factores están atenuados, pero presentan una mayor capacidad para producir biofilm [4-5].

1.2.1. Factores de virulencia de infección invasiva aguda por *P. aeruginosa*

Se postula que en la infección aguda por *P. aeruginosa* se producen tres estadios: adherencia y colonización; invasión y destrucción local y por último, diseminación sistémica. Cada estadio es requisito necesario para el siguiente, pero la cadena infectiva puede detenerse en cualquiera de los tres estadios. En cada uno de estos estadios predominan una serie de determinantes de virulencia que permiten a *P. aeruginosa* establecer la infección. La **tabla 1** recoge los principales determinantes de virulencia que intervienen en cada estadio de la infección.

Tabla 1. Principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa*.

Principales determinantes de virulencia	Celulares (Parte de la estructura bacteriana)	Extracelulares (secretados por la bacteria al exterior)
Adhesión y Colonización	- Flagelo (movilidad) - Fimbrias (adherencia al epitelio)	- Alginato (biofilm, cepas mucoides) - Píocianina (adherencia)
Invasión tisular y Destrucción local		Citotoxicidad tisular - Sistema de secreción tipo III (exoS/exoU) - Proteasas (elastasa, proteasa alcalina) - Lipasas y fosfolipasas - Leucocidina y hemolisinas - Sideróforos (pioverdina) - Píocianina - Exotoxina A
Diseminación y Respuesta Inflamatoria Sistémica	Toxicidad sistémica - Lípido A o endotoxina	Invasión vascular y toxicidad sistémica - Exotoxina A - Exoenzima S

1.2.1.a) Adhesión y colonización tisular.

Entre los factores de virulencia que favorecen la adhesión al epitelio y la consecuente colonización podemos destacar los siguientes:

-) **Flagelo:** *P. aeruginosa* presenta un flagelo polar que permite la motilidad mediante un movimiento circular en “sacacorcho”. Este flagelo favorece también la adhesión a las células epiteliales del huésped y el inicio de la cascada inflamatoria [5-6].
-) **Pilli o fimbrias:** Son unas proyecciones externas filiformes que presenta la bacteria en sus polos que favorecen la adherencia a las células del huésped, siendo las principales adhesinas de la bacteria [4-6]. También intervienen en la motilidad y en la agregación bacteriana favoreciendo la formación del biofilm [5].

1.2.1.b) Invasión y destrucción tisular local.

Una vez unida a la célula del huésped, la bacteria comienza a secretar factores de virulencia que conducen al daño tisular local y que desencadenan la respuesta inflamatoria. Entre estos determinantes de virulencia podemos destacar:

Ñ **Sistema de Secreción Tipo 3 (SSTT):** Es el principal determinante de virulencia de *P. aeruginosa* de las infecciones invasivas agudas, en las que su expresión se asocia a un peor pronóstico y una mayor mortalidad [4-6]. El SSTT permite inyectar unas citotoxinas (denominadas proteínas efectoras) al citoplasma de la célula del huésped [4-6, 10]. Así, cuando la bacteria se une a la superficie de la célula del huésped, el SSTT forma un pequeño canal mediante un conjunto de proteínas por el que entran estas citotoxinas efectoras al interior de la célula. Se han identificado cuatro proteínas efectoras: ExoS, ExoY, ExoU y ExoT. ExoU es la más potente, considerándose la más patogénica [4-5, 11]. Produce daño irreversible al provocar pérdida de la integridad de la membrana celular que conduce a una rápida muerte celular [4-6]. ExoS producen un alteración irreversible en el citoesqueleto celular, que lleva a la muerte celular. ExoT produce un efecto semejante a ExoS, pero sin tener tanta importancia en la patogénesis de la infección por *P. aeruginosa*. ExoY ha sido descubierta recientemente y su papel todavía no está bien establecido [6]. Estas proteínas efectoras se expresan de forma variable de unas cepas de *P. aeruginosa* a otras. La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* expresan tanto el genotipo *exoY* como *exoT*. Sin embargo, los genotipos *exoU* y *exoS* son prácticamente excluyentes; siendo las cepas *exoU*⁺ las que presentan un peor pronóstico y a una mayor mortalidad [5, 12].

) **Proteasas, lipasas y fosfolipasas:** *P. aeruginosa* secreta varias enzimas capaces de degradar diferentes componentes de la superficie celular y matriz intracelular del huésped (inmunoglobulinas, fibrinógeno, complemento, surfactante celular...) [4, 5]. La elastasa y la proteasa alcalina son las que más claramente se asocian a la patogenicidad de *P. aeruginosa*, produciendo ambas necrosis tisular. La elastasa es capaz de hidrolizar el revestimiento de elastina de los vasos sanguíneos provocando la hemorragia y necrosis observada en algunas infecciones por *P. aeruginosa*. La proteasa alcalina actúa sobre los factores de coagulación [6]. Otras proteínas tóxicas producidas por *P. aeruginosa* que contribuyen a su invasión son las **citotoxinas** (leucocidina) o las **hemolisinas** (fosfolipasa C y ramnolípido).

) **Pigmentos:** *P. aeruginosa* se caracteriza por la producción de algunos pigmentos, que intervienen en la virulencia de la bacteria. Entre estos pigmentos se encuentra la piocianina, pigmento verde-azulado exclusivo de esta especie que le da una coloración característica a la *P. aeruginosa*. La piocianina induce apoptosis de neutrófilos, inhibe fagocitosis por los macrófagos y la expresión de citoquinas del huésped e interfiere en el estrés oxidativo [4, 13]. Por otro lado, la piocianina posee efecto tóxico para otras bacterias, retrasando el crecimiento de otras poblaciones bacterianas y eliminando la competencia con la flora autóctona, con lo que favorece la colonización por *P. aeruginosa*. La pioverdina, de color verde-amarillento, es un pigmento sideróforo fundamental para la bacteria, ya que le permite utilizar el hierro necesario para su supervivencia al secuestrarlo de los depósitos del huésped y favorecer su quelación [5, 14]. Otros pigmentos producidos por *P. aeruginosa* en menor cuantía son la piorubina (rojizo) o piomelanina (marrón negruzco) [2].

1.2.1.c) Diseminación y respuesta inflamatoria sistémica.

En la diseminación y respuesta inflamatoria sistémica de la infección por *P. aeruginosa* intervienen tanto factores de virulencia celulares como extracelulares:

-)] **Lípido A o endotoxina:** El lípido A del lipopolisacárido de la membrana externa es un potente estímulo inmunológico que provoca la liberación de péptidos vasoactivos, citoquinas, factores del sistema complemento y de la coagulación favoreciendo la respuesta inflamatoria sistémica. Se considera que el lípido A es el responsable de la aparición del shock séptico.

-)] **Exotoxina A:** es una citotoxina extracelular que inhibe la síntesis de proteínas y altera la función mitocondrial lo que conduce a la muerte celular [4-5]. Su presencia está asociada a una mayor patogenicidad de las cepas de *P. aeruginosa* [15]. Interviene tanto en la infección local (favoreciendo la invasión, el daño tisular y la necrosis) como en la sistémica (diseminación sistémica).

-)] **Exoenzima S:** Enzima extracelular que interviene en la adherencia bacteriana al epitelio; ejerce funciones citotóxicas y tiene actividad inmunosupresora, favoreciendo la invasión vascular y la diseminación sistémica de la infección [16].

1.2.2. Factores de virulencia de infección crónica por *P. aeruginosa*:

) **Quorum sensing:** Es un fenómeno que favorece la adaptación y supervivencia de las bacterias en el medio al actuar de forma coordinada, mediante un complejo mecanismo de comunicación bacteria-a-bacteria que permite su acción de manera colectiva [4-6, 14, 17]. Por medio de ciertas moléculas químicas señalizadoras las bacterias son capaces de saber si existen otras bacterias de su misma especie en el medio y, al alcanzar determinada densidad de población, se comportan de forma diferente a cuando estaban solas iniciando una respuesta genética coordinada que favorece su adaptabilidad y supervivencia en el medio [4-5]. El sistema de quorum sensing es fundamental para formación del biofilm e interviene en otros aspectos como la producción de toxinas extracelulares, de pigmentos o en la aparición de resistencia antibiótica [4, 6, 17, 18].

) **Biofilm:** La capacidad de formar biofilm es una característica clave para la sostenibilidad de *P. aeruginosa* en el ambiente [4-5]. Los biofilms son estructuras de comunidades bacterianas altamente organizadas, en las que las bacterias se encuentran adheridas entre sí y a una superficie de forma irreversible. En ellas, las bacterias se encuentran contenidas en un matriz de sustancias poliméricas extracelular producidas por las mismas bacterias, que constituye la mayor parte del biofilm (50-85%). Un componente esencial de esta matriz extracelular es el **alginato**, que es un exopolisacárido producido fundamentalmente por las cepas mucoides características de las infecciones respiratorias persistentes (principalmente en pacientes con fibrosis quística) [4, 19].

La formación del biofilm requiere inicialmente la adhesión de bacterias a lo que contribuyen los pili y el flagelo. El sistema quorum sensing favorece la organización de las bacterias mediante señales química y posteriormente favorecerá el inicio de la

producción de matriz extracelular. A medida que madura el biofilm adopta forma sésil o de setas, y entre estas formaciones, se intercalan canales que permiten el flujo de nutrientes y de productos de desecho.

El biofilm sirve de reservorio a la infección ya que dificultan su erradicación al proporcionar a la comunidad bacteriana protección frente al sistema inmune y a los antibióticos (al protegerlas de la fagocitosis y al disminuir la penetración de agentes tóxicos) [4]. La adaptación a largo plazo en el biofilm está favorecida por la adaptabilidad genética de *P. aeruginosa*, ya que las cepas que forman el biofilm son capaces de producir una serie de mutaciones que las confieren a una mayor adaptabilidad al medio a expensas de perder virulencia [4].

Figura 3. Imagen del biofilm de *P. aeruginosa* sobre una sutura

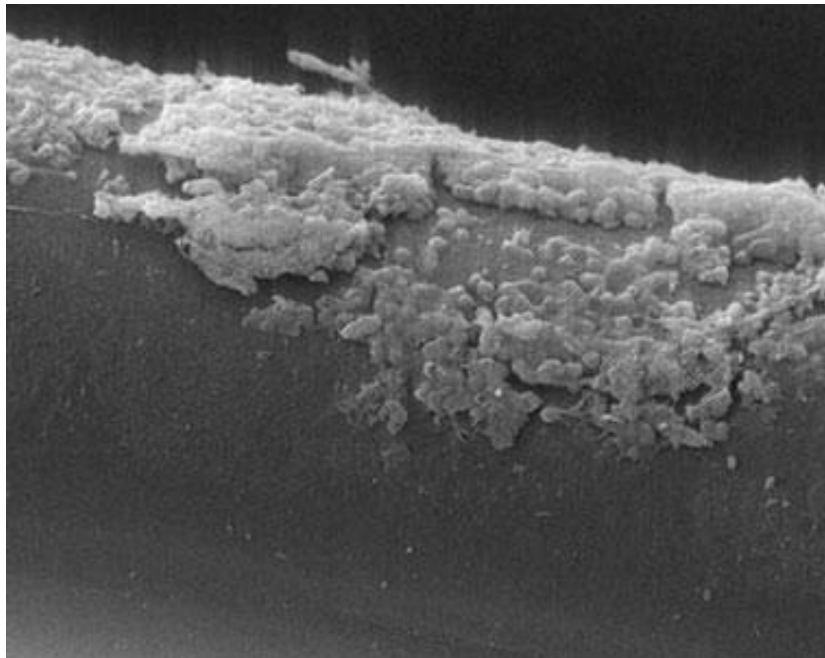


Figura 3. Adaptado de De Kievit TR [Ref. 17]

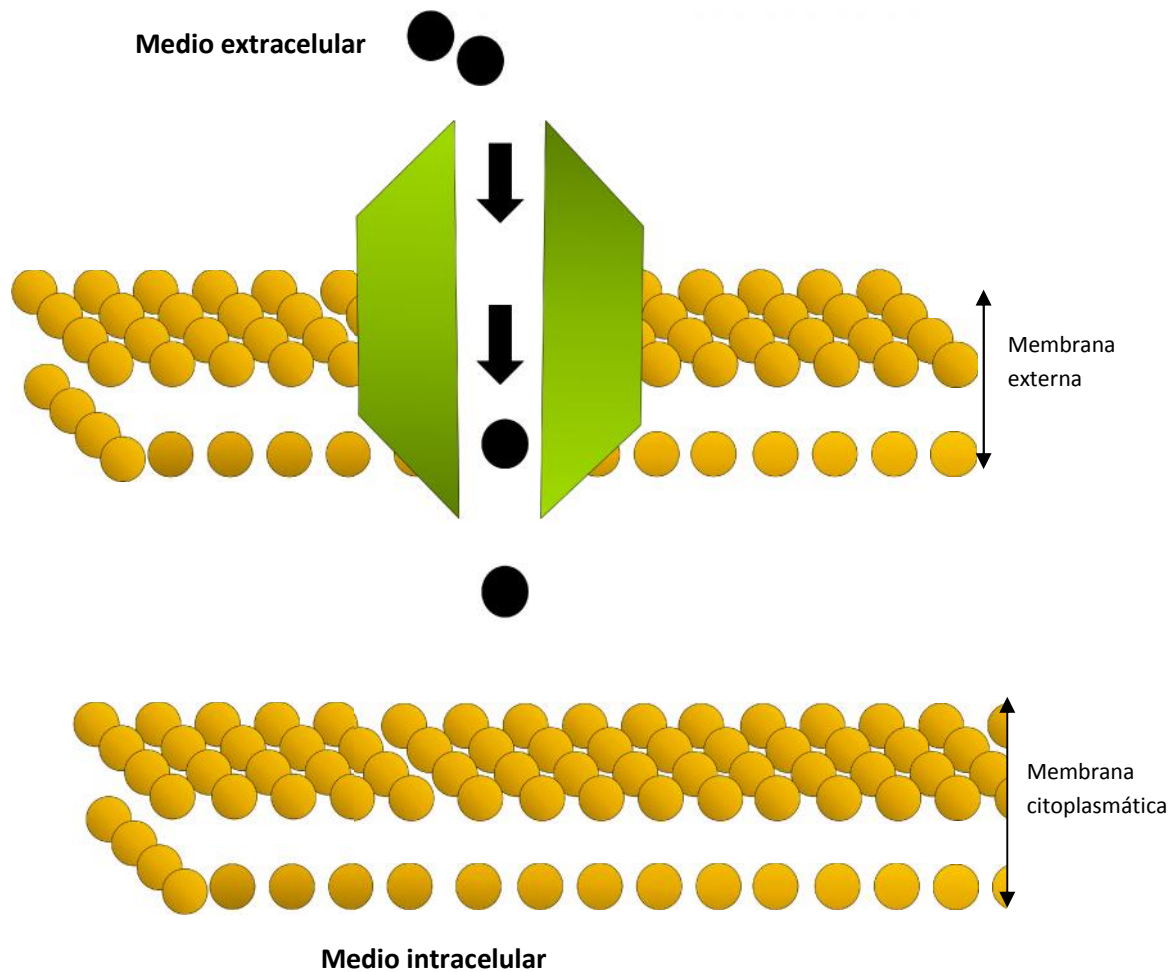
1.3. Mecanismos de resistencia antibiótica en *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa posee una resistencia intrínseca a un amplio número de antibióticos, lo que junto con su extraordinaria capacidad de adquirir resistencias en el curso de la antibioticoterapia, hace que sea capaz de presentar resistencia a la mayoría de los antibióticos antipseudomónicos disponibles [20]. Tanto las resistencias intrínsecas como las adquiridas permiten que *P. aeruginosa* pueda acumular diferentes mecanismos de resistencia lo que contribuye a la aparición de cepas de multirresistentes (MDR) o extremadamente resistentes (XDR), limitando las opciones terapéuticas de este tipo de infecciones. Los principales mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* están recogidos en la **tabla 2** (página 44).

1.3.1. Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca o natural es aquella que presenta la bacteria en forma basal o salvaje. En el caso de *P. aeruginosa* es muy elevada, presentando resistencia basal a los antimicrobianos superior que la mayoría de las bacterias gram negativas (BGN) [9, 20]. Esta resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* viene determinada por:

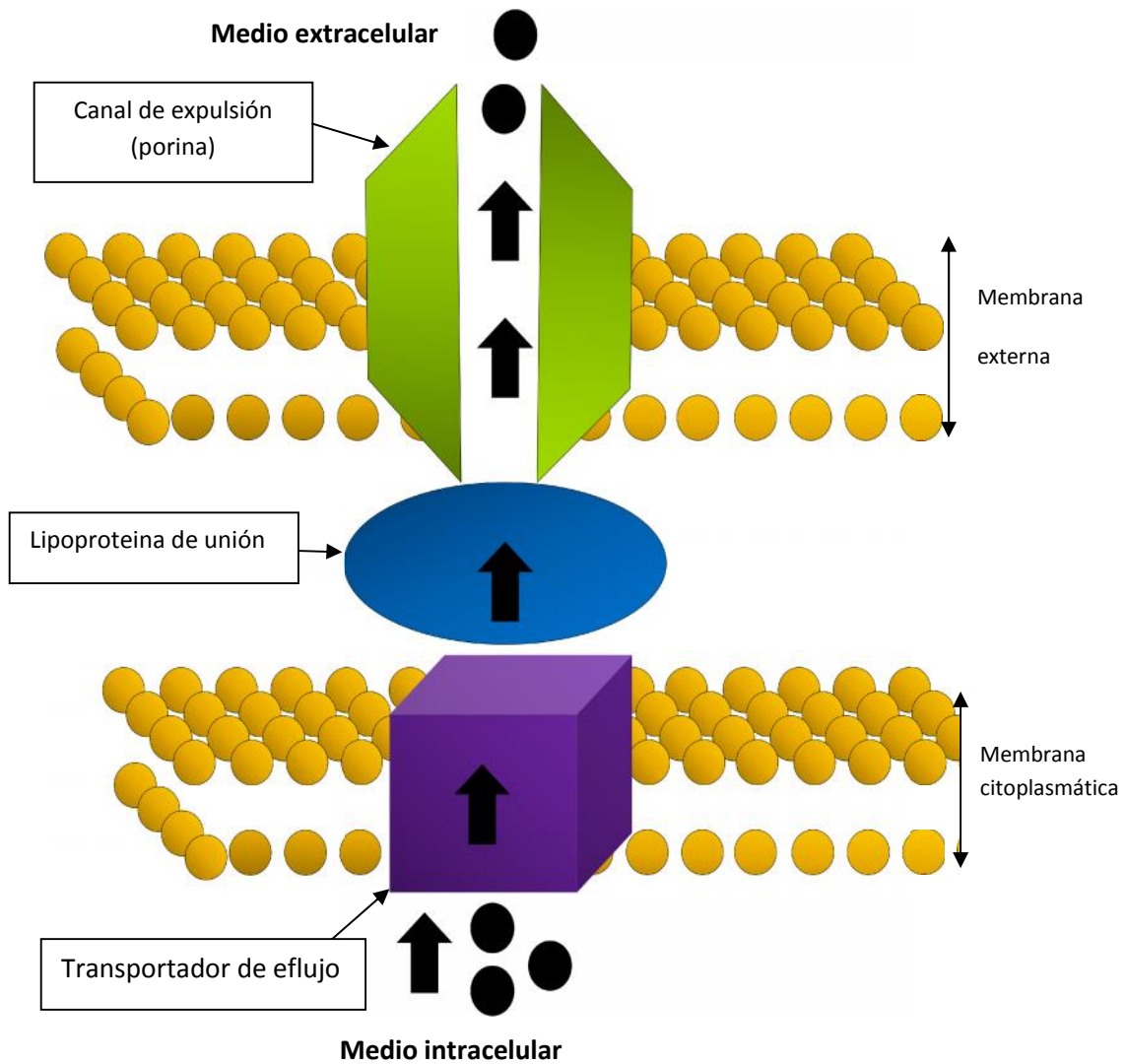
-) **Baja permeabilidad de la membrana:** debida a la estructura de la membrana externa que es hidrófoba y al reducido número de canales de entrada o porinas. Las **porinas** son canales de la membrana externa que permiten el paso al interior de sustancias hidrofílicas como los betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas o algunas fluoroquinolonas. La pérdida o disminución del número de estas porinas limita drásticamente el acceso de estos antibióticos al interior de la célula [21]. Existen unas porinas inespecíficas entre las que destaca la OprF, utilizada como canal de entrada por muchos antibióticos, y la OprC. También existen porinas selectivas, entre las que destaca la OprD que es el canal de entrada principal para los carbapenémicos.

Figura 4. Esquema de las porinas en la membrana externa de *P. aeruginosa*

-) **Presencia de bombas de expulsión activa constitutivas:** contribuyen a la resistencia natural a los betalactámicos y otros antibióticos. La más frecuente de estas bombas de expulsión es la MexAB-OprM que suele expresarse de forma constitutiva. Estas bombas de expulsión están compuestas por un conjunto de tres proteínas que son capaces de expulsar el antibiótico al exterior de la bacteria: un transportador de eflujo situado en la membrana citoplasmática (en el caso de la MexAB-OprM es el MexB), una lipoproteína de unión entre los otros dos componentes (Mex A) y una proteína con estructura de porina anclada en la membrana externa que actúa como canal de expulsión (OprM). La MexAB-OprM confiere resistencia a la mayoría de los β -lactámicos, quinolonas, cloranfenicol y tetraciclinas, sin afectar la susceptibilidad de aminoglucósidos. Por el

contrario, la bombas de expulsión MexXY-OprM contribuye a la resistencia basal de *P. aeruginosa* a los aminoglucósidos [21, 22].

Figura 5. Esquema de las bombas de expulsión activa de *P. aeruginosa*



) **Producción de β -lactamasa cromosómica inducibles tipo AmpC:** confiere a *P. aeruginosa* resistencia intrínseca a aminopenicilinas y a la mayoría de las cefalosporinas de primera y segunda generación, ya que son hidrolizados por esta enzima. Éstos antibióticos además son potentes inductores de esta enzima, como también lo son los carbapenémicos [9, 22]. Otras dos lactamasas intrínsecas de *P. aeruginosa* son la OXA-50 y la imipenemasa [9].

1.3.2. Resistencia adquirida.

La resistencia adquirida ocurre por mutaciones de novo o por la transferencia horizontal de genes de una bacteria a otra [9, 23-25].

1.3.2.a) Mutaciones de novo:

Consisten en la modificación mediante mutaciones del material cromosómico propio. La selección de estas mutantes resistentes se ve asociado al uso de antibioticoterapia antipseudomónica, así la inactivación de la porina OprD se asocia al consumo de imipenem y la hiperactivación de las bombas de expulsión activa al consumo de quinolonas.

) **Sobreexpresión de AmpC:** Debido a mutaciones la betalactamasa puede transformarse en constitutiva. La presión antibiótica selecciona estas mutaciones "desreprimidas" que son capaces de hiperproducir este enzima conduciendo a la resistencia a todos los betalactámicos, excepto los carbapenémicos. Existen diferentes niveles de desrepresión, siendo el nivel de resistencia observada proporcional a la cantidad de enzima producida. En general, las cepas están parcialmente desreprimidas [26].

) **Inactivación de la porina OprD:** La porina OprD es una porina específica que sirve como canal de entrada de los carbapenémicos al interior de la célula [20]. Una disminución o pérdida de esta porina confiere una resistencia selectiva al imipenem (con una disminución de la susceptibilidad al meropenem), sin condicionar la resistencia al resto de los β -lactámicos. La inactivación de OprD aparece frecuentemente en relación con exposición previa a imipenem [22].

) **Sobreexpresión de bombas de expulsión activa**, siendo la más frecuente la sobreexpresión de la bomba MexAB-OprM que conduce a la resistencia a carbapenémicos, especialmente al meropenem mientras que la sensibilidad del imipenem no se modifica. La sobreexpresión de MexXY-OprM la confiere a cefepime y aminoglucósidos. Menos frecuentes son las bombas de expulsión MexCD-OprJ y MexEF-OprM, ambas afectan fundamentalmente a quinolonas [9, 22].

) **Mutaciones en topoisomerasas II y IV**: las quinolonas actúan inhibiendo las enzimas implicadas en la replicación del ADN, particularmente la topoisomerasa II o ADN girasa (codificada por *gyrA/gyrB*) y la topoisomerasa IV (codificada por *parC/E*). La mutación de estos genes disminuye el grado de afinidad de las quinolonas por estas enzimas, siendo uno de los mecanismos fundamentales de resistencia a quinolonas [22].

1.3.2.b) Transferencia genética horizontal de determinantes de resistencia.

Actualmente se considera la transferencia horizontal de material genético es uno de los principales mecanismos de expansión de los genes de resistencia antibiótica, permitiendo a la bacteria transmitir los determinantes de resistencia de una forma rápida y eficaz [9, 24]. La transferencia horizontal de material genético se puede producir mediante conjugación (la bacteria transfiere el material genético a otra bacteria por contacto entre ambas mediante puentes de conjugación); transformación (la absorción e incorporación de material genético ambiental se introduce por medio de plásmidos) o por transducción (el ADN es transferido de una bacteria a otra mediante un virus bacterianos o bacteriófagos) [24].

La transferencia genética horizontal de determinantes de resistencia en *P. aeruginosa* está aumentando a nivel mundial en los últimos años como lo demuestra el aumento global de cepas productoras de carbapenemasas y de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que son las principales β -lactamasas adquiridas mediante transferencia horizontal [9]. Las **carbapenemasas o metalo- β -lactamasas (MBL)** producen resistencia a todos los betalactámicos incluyendo los carbapenémicos, sin hidrolizar el aztreonam. Las principales carbapenemasas descritas son la IMP, VIM, SPM y GIM [22]. Las **β -lactamasas con espectro extendido** son enzimas plasmídicas que confieren resistencia frente al conjunto de betalactámicos a excepción de los carbapenémicos. Además, se han descrito otras betalactamasas codificadas por genes situados en plásmidos que se clasifican en tres grupos: grupo PSE o CARB (carbenicilinasas); el grupo OXA (oxacilinasas) y el grupo TEM.

Los genes responsables de la producción de MBL o BLEE suelen formar parte de integrones, que son estructuras genéticas móviles que se localizan en el cromosoma pero que pueden comportarse también como plásmidos transferibles, facilitando la diseminación de estas resistencias de una bacteria a otra [22]. La localización de los genes que codifican estas β -lactamasas se encuentran adyacentes a los que codifican la resistencia de aminoglucósidos, de forma que generalmente se transfieren asociados con lo que aumenta la posibilidad de presentar de forma simultánea resistencia a los aminoglucósidos [9]. Estas **enzimas modificadoras de aminoglucósidos** modifican el grupo amino o hidroxilo de los aminoglucósidos condicionando resistencia a los mismos [22].

Tabla 2. Principales mecanismos de resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa*.

	MECANISMO DE RESISTENCIA	MECANISMO DE ACCIÓN	EFFECTO PRODUCIDO	ANTIBIÓTICOS AFECTADOS	
Resistencia intrínseca	Disminución permeabilidad membrana	- Características membrana (hidrófoba) - Porinas inespecíficas (OprF) - AmpC inducible	Alteración permeabilidad de la membrana	Impermeabilidad inespecífica de membrana	β-lactámicos FQUIN
	B-lactamasas cromosómica inducible	- OXA-50 - Imipenemasa	Resistencia de naturaleza enzimática	B-lactamasas (hidrólisis β-lactámicos)	Aminopen/ Cefalosporinas Aminopen (IPM) IPM
	Bombas de expulsión activa	- MexAB-OprM - MexXY-OprM	Alteración permeabilidad de la membrana	Expulsión activa de moléculas al exterior celular	β-lactámicos, FQUIN + AG
Resistencia adquirida	Mutaciones <i>de novo</i>	- Desrepresión AmpC	Resistencia enzimática	Sobreexpresión AmpC	TZP, CAZ, FEP
		- Inactivación porina OprD	Alteración permeabilidad de la membrana	Porina selectiva (limita entrada carbapenémicos)	IPM (MEM)
		- Topoisomerasas II (gyrA) - Topoisomerasas IV (parC)	Modificación de la afinidad de la diana	Disminuye afinidad por enzimas diana de quinolonas	FQUIN
		- Sobreexpresión bombas expulsión activa MexAB-OprM MexXY-OprM MexCD-OprJ MexEF-OprN	Alteración permeabilidad de la membrana	Expulsión activa de moléculas al exterior celular	TZP, CAZ, FEP, MEM, CIP FEP, MEM, TOB, CIP FEP, CIP IPM, MEM, CIP
Transferencia horizontal	- Mutación del lipopolisacárido - Metallo-β-lactamasas	Alteración permeabilidad membrana	Modificación membrana externa	CST IPM, MEM	
	- β-lactamasa de espectro extendido - Enzimas modificadoras de AG	Resistencia de naturaleza enzimática	B-lactamasas B-lactamasas Modificación grupo amino o hidroxilo de aminoglucósidos	β-lactámicos AG	

Abreviaturas: FQ, fluoroquinolonas; AG, aminoglucósidos; IPM, imipenem; MEM, meropenem; TZP, piperacilina-tazobactam; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacino; TOB, tobramicina; CST, colistina.

2. Epidemiología de *Pseudomonas aeruginosa*

2.1. Colonización e infección por *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es uno de los patógenos nosocomiales más frecuentes, siendo responsable de un 10% de las infecciones intrahospitalarias [27, 28]. Este porcentaje es todavía mayor cuando nos referimos a la población de pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos (UCIs), siendo la primera causa de neumonías asociadas a ventilación mecánica [9, 29]. *P. aeruginosa* produce infecciones con elevada morbilidad y mortalidad, con una mortalidad del 30-40% en el caso de neumonías o bacteriemias [9, 29-30].

Debido a su predilección por ambientes húmedos y a sus escasos requerimientos nutricionales, *P. aeruginosa* puede encontrarse en el ambiente hospitalario colonizando grifos, sumideros o equipos sanitarios en contacto con aguas (equipos respiratorios o de diálisis, colirios, soluciones limpieza, humidificadores...) [2].

P. aeruginosa generalmente no forma parte de la flora habitual del ser humano, aunque puede encontrarse en un pequeño porcentaje de individuos sanos (hasta un 7%) [2]. La tasa de colonización en cambio aumenta en pacientes hospitalizados o relacionados con el ámbito sanitario, presentando tasas especialmente altas aquellos sometidos a ventilación mecánica, cirugías, tratamiento antibiótico de amplio espectro o quimioterapias [2]. Las localizaciones más habituales de colonización por *P. aeruginosa* son el tracto intestinal y zonas húmedas como la mucosa nasal o faríngea, zona perineal, axilar u otras zonas húmedas de la piel [2, 3].

De forma clásica se considera que habitualmente existe un periodo de colonización que precede a la infección invasiva por *P. aeruginosa* [2, 31]. Los estudios sugieren que existen dos rutas fundamentales de colonización por *P. aeruginosa* [31-36]:

) **Colonización endógena:** causada por la flora del propio paciente [31-32, 37].

Inicialmente existe una colonización prácticamente indetectable de *P. aeruginosa*, pero el consumo de antibióticos sin actividad antipseudomónica ejerce una presión selectiva al erradicar la flora saprófita habitual, favoreciendo el crecimiento selectivo de *P. aeruginosa*, con el consiguiente aumento de su carga bacteriana y posterior detección en muestras epidemiológica. Se considera que el tracto gastrointestinal es el principal reservorio endógeno de *P. aeruginosa* que precede a la posterior infección y/o colonización en otras localizaciones [31-33, 37-38]. La colonización endógena se caracteriza por ser de naturaleza policlonal o no epidémica. El principal factor de riesgo para este tipo de colonización es el consumo previo de antibióticos [31, 34].

) **Colonización exógena:** en este tipo de colonización los pacientes se colonizan a partir de

reservorios ambientales colonizados (equipos sanitarios contaminados, agua...) y/o a partir de otros pacientes colonizados a través de las manos del personal sanitario, lo que se conoce como colonización horizontal o cruzada. La colonización exógena es de carácter monoclonal, con un clon compartido por la mayoría de los pacientes. La importancia de esta colonización exógena ha sido ampliamente descrita en el contexto de brotes epidémicos [32-33, 35, 37, 39-40], pero también en situaciones endémicas [33, 35-36, 40-42]. Se han descritos brotes asociados a reservorios ambientales contaminados [36, 42]. Sin embargo, los propios pacientes colonizados también representan una fuente exógena continua de microorganismo para colonizar a otros pacientes [33, 41, 43].

De lo anterior se desprende que la epidemiología de *P. aeruginosa* es compleja y variable según las características particulares de cada medio. Conocer la epidemiología de cada hospital y las principales rutas de colonización es fundamental para diseñar estrategias efectivas de control y prevención de la infección [2, 31, 35, 36, 44]. Mientras que en la colonización endógena es prioritario disminuir la presión antibiótica recibida por los pacientes, en la colonización exógena habrá que mejorar las medidas de control para evitar la colonización cruzada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la colonización exógena también se ve influida por una elevada presión antibiótica que confiere una ventaja de crecimiento selectivo a la bacteria, por lo que en estos casos también es fundamental el control del consumo antibiótico [31, 35].

2.2. Epidemiología de la multirresistencia en *P. aeruginosa*

2.2.1. Multirresistencia: Situación actual y gravedad del problema.

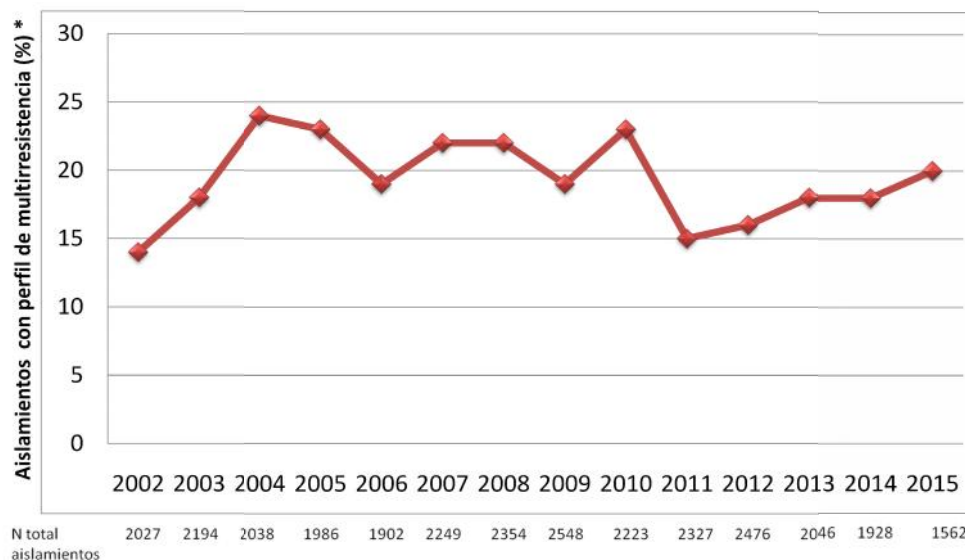
Actualmente, la resistencia antimicrobiana es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una de las principales amenazas para la salud pública mundial. *P. aeruginosa* se encuentra entre los seis principales patógenos del medio hospitalario, habiéndose etiquetado recientemente como uno de los patógenos "ESKAPE" (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp.*). El concepto "ESKAPE" se ha utilizado para enfatizar que estos microorganismos son los responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales a nivel mundial y son paradigma de patógenos capaces de desarrollar resistencias y "escapar" de los tratamientos antibióticos habituales [45, 46]. En el caso de *P. aeruginosa*, la emergencia de cepas multirresistentes y extremadamente resistentes limita enormemente las posibilidades terapéuticas y ha obligado a recuperar fármacos como las polimixinas o los aminoglucósidos que habían caído en desuso por su toxicidad.

Según los datos publicados en el estudio de vigilancia del 2014 del European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [47], las tasas de resistencia antimicrobiana en Europa en *P. aeruginosa* siguen aumentando, fundamentalmente en Europa del este y sureste. Según este estudio, un 15% de los aislamientos europeos de *P. aeruginosa* presentaban un perfil de multirresistencia y un 6% de extrema resistencia. Los datos de España eran semejantes a los de la medida europea (13% multirresistencia) con los siguientes porcentajes de resistencia por familia de fármacos: 25% para quinolonas, 19% para carbapenémicos, 17% para aminoglucósidos, 10% para cefalosporinas antipseudomónicas y 8% para penicilinas antipseudomónicas. Otros estudios también han demostrado que la prevalencia de *P. aeruginosa* multirresistente en la última década es de un 15-30%, cumpliendo en muchos casos criterios de extrema resistencia [9, 48-51].

2.2.2. Evolución de *P. aeruginosa* multirresistente en el Hospital Universitari de Bellvitge: perspectiva histórica.

A lo largo de las dos últimas décadas se ha objetivado en nuestro hospital un aumento de los aislamientos por *P. aeruginosa* multirresistente, con unos porcentajes mantenidos de multirresistencia en torno al 20%, tal y como se muestra en la **figura 6**. Este porcentaje es todavía superior en pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos.

Figura 6. Evolución de la multirresistencia de *P. aeruginosa* (2002-2015) en el Hospital Universitari de Bellvitge.



*Aislamientos de *P. aeruginosa* con perfil de multirresistencia según las definiciones actuales (resistencia a uno o más fármacos en tres o más familias con actividad antipseudomónica).

En el Hospital Universitari de Bellvitge se constató a partir del 2002 que hasta un 30% de los aislamientos de *P. aeruginosa* presentaban resistencia a carbapenémicos, y de éstos, un 60% mostraban un perfil de multirresistencia. Gracias a la realización de estudios moleculares, se pudo identificar la presencia de un clon epidémico de *P. aeruginosa* con un perfil fenotípico de extrema resistencia establecido por todo el hospital. Este clon epidémico fue identificado mediante estudios de MLST como el **ST-175** y era el responsable del aumento de

multirresistencia que se había producido en nuestro centro, estando implicado en la mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistente de nuestro hospital [41].

Figura 7. Imagen de disco-difusión del clon ST-175.



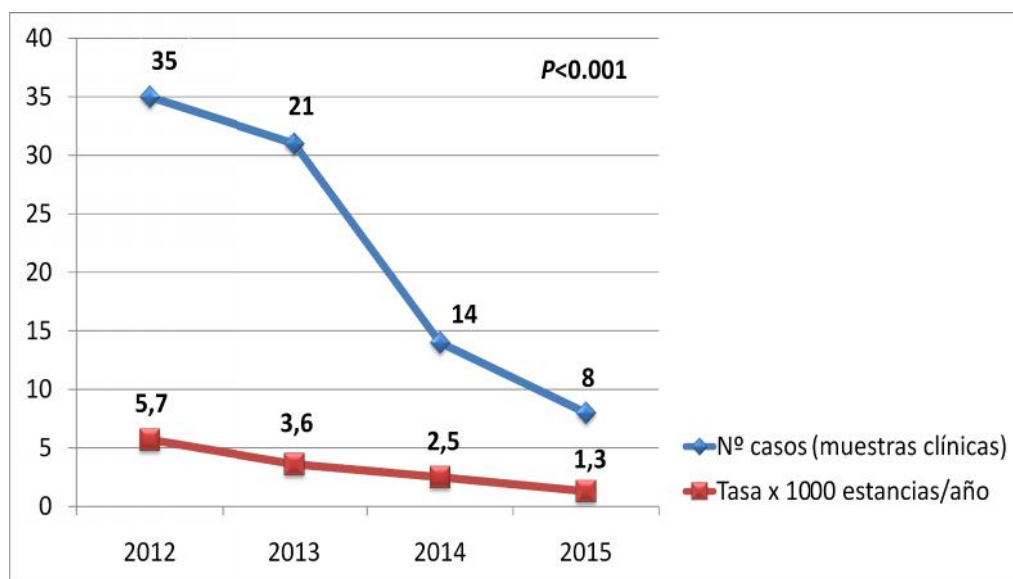
Imagen por cortesía de la Dra. Fe Tubau (Servicio Microbiología, H. Bellvitge)

Los estudios epidemiológicos realizados inicialmente demostraron que los reservorios ambientales tenían escaso protagonismo en el mantenimiento de la epidemia y por el contrario el reservorio principal era el humano, de forma que los pacientes colonizados eran la fuente exógena fundamental para la colonización de otros pacientes y la presión antibiótica favorecía la selección y diseminación de este clon [41].

Ante estos hallazgos y con el objetivo de erradicar dicho clon, durante los años posteriores se aplicó en nuestras UCIs un programa estandarizado para el control de BGNs multirresistentes que incluyó, entre otras medidas, la vigilancia activa de colonización rectal, la higiene diaria de los pacientes con jabón de clorhexidina, la optimización del uso de los antibióticos y la realización de cohorting [52, 53]. A pesar de estas medidas, este clon se mantuvo de forma sostenida en nuestro hospital a lo largo de los años posteriores pudiéndose hablar de una

situación de endemia persistente. Ante este escenario se sospechó que el reservorio ambiental podría tener también un papel importante en el mantenimiento de la endemia por lo que a mediados del 2014 se planteó una intervención sobre los reservorios húmedos en la UCI (picas lavamanos), como había sido sugerido por algún estudio previo [54]. La intervención consistió en la retirada de los lavamanos de las habitaciones de los pacientes de la UCI, junto con el uso de agua filtrada con filtros bacterianos para la higiene de los pacientes y el recambio trimestral de los sifones de los lavamanos centrales. Dichas medidas condujeron a una disminución muy significativa de *P aeruginosa* multirresistente tal y como se observa en la **figura 8**. Esta última estrategia sugiere que el reservorio ambiental, habitual en los microorganismos no fermentadores, tuvo un protagonismo en la persistencia del brote epidémico, junto con la contribución adicional del huésped colonizado.

Figura 8. Descenso del número de aislamientos de *P. aeruginosa* extremadamente resistente tras la intervención sobre las picas-lavamanos de la UCI.



* Número de casos representa el número de muestras clínicas con *P. aeruginosa* extremadamente resistente (XDR).

Junto con la endemia persistente de ST-175, en esta última década también se han documentado en nuestro hospital otros brotes epidémicos colaterales, de menor extensión, debidos a cepas de *P. aeruginosa* multirresistente y extremadamente resistentes. Entre estos se encuentra un brote producido por la cepa identificada con MLST como el clon ST-111, cuya peculiaridad fenotípica fue la de presentar resistencia al cefepime con sensibilidad mantenida a la ceftazidima (FEP^R CAZ^S) [55] y algunos brotes producidos por cepas productoras de metalo-B-lactamasa como el ocurrido en los años 2005 y 2006 [56].

Finalmente, en los años más recientes se está produciendo en el Hospital Universitari de Bellvitge un aumento alarmante de aislamientos de *P. aeruginosa* productora de MBL como se observa en la **figura 9**. De hecho, en el 2015 un tercio de las cepas de *P. aeruginosa* con perfil de multirresistencia de nuestro hospital fueron debidas a cepas de *P. aeruginosa* productora de MBL. Dentro de éstas, en nuestro medio existen dos clones predominantes que representan el 90% de los aislamientos de *P. aeruginosa* productora de MBL: el clon ST-235 (productor de VIM-2) y ST-253 (productor de VIM-1), siendo predominante el clon ST-235 [resultados presentados en el XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC 2014 y en el congreso internacional 54th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, ICAAC 2014].

Figura 9. Distribución de los aislamientos de *P. aeruginosa* productora de metalo-beta-lactamasa (MBL) en el Hospital Universitari de Bellvitge (2004-2015)

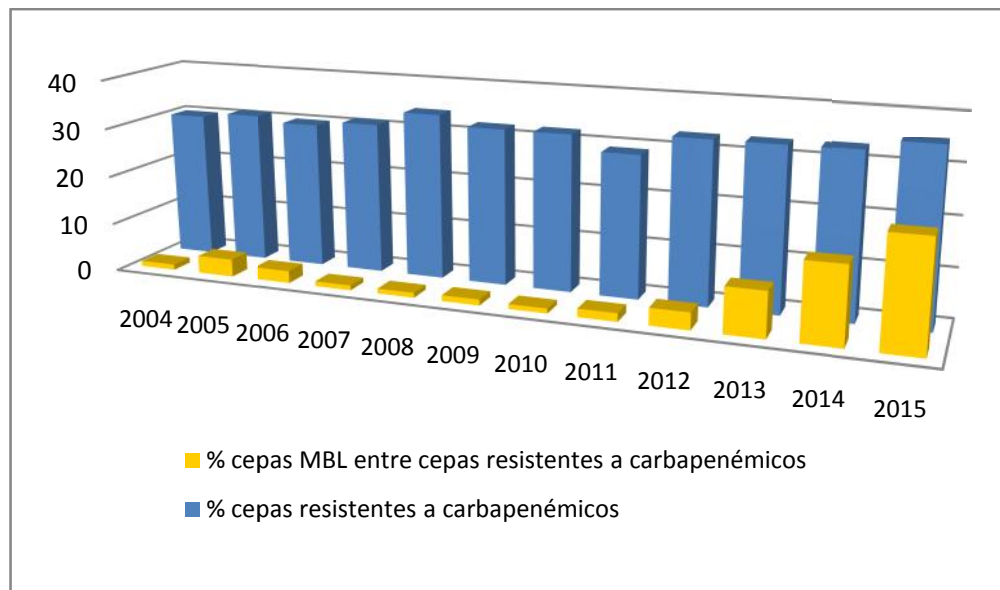


Figura 9. En azul el porcentaje de cepas resistentes a carbapenémicos del total de los aislamientos con *P. aeruginosa* en el Hospital Universitari de Bellvitge. En amarillo, el porcentaje de aislamientos con *P. aeruginosa* productora de metalo-beta-lactamasas (MBL).

2.2.3. Clones epidémicos de alto riesgo (high-risk clones).

Durante las últimas décadas diferentes publicaciones describieron la existencia de brotes epidémicos nosocomiales de *P. aeruginosa* MDR/XDR, que se consideraban circunscritos a cada hospital [36, 41, 55-56]. Sin embargo, estudios posteriores comprobaron que la mayoría de estos clones no se encontraban limitados a un único hospital, sino que presentaban una distribución más amplia de lo que inicialmente se había considerado [57-59]. Investigaciones más recientes han avanzado en este aspecto demostrando que existen una serie de clones de *P. aeruginosa* con una distribución internacional, que estos clones son los responsables de la mayoría de las infecciones producidas por *P. aeruginosa* MDR/XDR a nivel mundial, habiéndoseles denominado clones epidémicos de alto riesgo o high-risk clones [9, 51, 60-66].

P. aeruginosa presenta una importante diversidad clonal, como se observa al estudiar las bases de datos de MLST en las que hay registrados más de 2000 serotipos de la especie (<http://pubmlst.org/paeruginosa>); pero esta diversidad clonal afecta fundamentalmente a las cepas sensibles que presentan un patrón de policlonalidad no endémico. Sin embargo, al analizar las cepas de *P. aeruginosa* con fenotipo multirresistente, y fundamentalmente con fenotipo extremadamente resistente, no existe tal diversidad sino que la mayoría de los aislamientos pertenece a unos pocos clones endémicos. Así, unos pocos genotipos de *P. aeruginosa*, fundamentalmente los clones ST-111, ST-175 y ST-235, son los responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales por *P. aeruginosa* MDR/XDR a nivel mundial. Estos tres genotipos corresponden a los tres high-risk clones más frecuentes a nivel internacional [9, 51, 60-63, 67, 68].

Estos clones epidémicos de alto riesgo se caracterizan por tener una capacidad excepcional de adquirir determinantes de resistencia por transferencia genética horizontal, lo que favorece que se asocien a fenotipos de multirresistencia y extremada resistencia. La asociación entre estos clones de alto riesgo y la transferencia horizontal de mecanismos de resistencia es muy

estrecha de forma que la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL o de BLEE pertenecen a estos clones de alto riesgo, fundamentalmente al ST-235 [9].

Dentro de los high-risk clones de *P. aeruginosa*, el ST-235 es el que presenta una distribución más amplia, habiéndose aislado en todos los continentes [9, 61, 64-66, 12, 69]. Dicho clon es el que presenta mayor relación con la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal [9], habiéndose asociado a diferentes β -lactamasas de espectro extendido (como PER-1, GES-1 y BEL-1) y a diferentes metalo-betalactamasas (como VIM-1, VIM-4 y IMP-1) [61, 64]. Además, estudios recientes han demostrado su asociación con una mayor patogenicidad al presentar determinantes de virulencia asociados al sistema de secreción tipo III [12]. El clon ST-111 también presenta una distribución mundial afectando a todos los continentes excepto Oceanía [9, 66]; y también se ha asociado a la producción de metalo-beta-lactamasa tipo VIM-2 [51, 61]. La distribución del clon ST-175 es más limitada, estando confinado fundamentalmente en Europa y Japón, pero es el clon más frecuente en el ámbito europeo [9, 51, 61]. Así, en España, el high-risk clon más frecuente es el ST-175, seguido del ST-111 [51]. El ST-175 no se ha asociado a la producción de metalo-betalactamasas y su perfil de resistencia deriva de la combinación de varios mecanismos de resistencia entre los que se encuentra la hiperproducción de AmpC, la inactivación porina OprD, mutaciones que alteran la función de las topoisomerasas, sobreexpresión de bomba de expulsión activa MexXY-OprM y enzimas modificadores de aminoglucósidos [51].

3. Multirresistencia y Coste Biológico.

Se entiende por fitness bacteriano la capacidad del patógeno de sobrevivir y reproducirse [24]. En general se acepta que la adquisición de mecanismos de resistencia antibiótica supone un coste fisiológico para la bacteria que conduce a una reducción de su fitness, lo que se conoce como coste biológico o “fitness cost” asociado a la resistencia [23, 24, 70]. Este coste metabólico es debido a que los antibióticos utilizan como dianas funciones básicas para las bacterias, como son la transcripción de material genético, la síntesis de proteínas o de la pared celular [23-25, 70]. Las mutaciones de resistencia condicionan la modificación de estas dianas, con lo que la bacteria pierde o empeora alguna de estas funciones que le son imprescindibles, suponiendo una carga metabólica para la bacteria [24]. Esta carga metabólica podría comprometer la virulencia de la bacteria al afectar su capacidad de crecimiento, de invasión o de supervivencia en el medio, así como limitar su capacidad de expresar determinantes de virulencia.

Diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han evidenciado la existencia de un coste biológico asociado a la multirresistencia [71-74]. Incluso, algunos autores han propuesto que debido al coste biológico, las cepas resistentes podrían estar en desventaja a la hora de competir con las sensibles en ausencia de presión antibiótica. Así por ejemplo, Nielsen *et al.* sugieren que la desaparición de un brote epidémico de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) pudo ser debido a que las cepas de SARM fueron desplazadas por cepas sensibles, tras un cambio en la política antibiótica que implicaba un menor consumo de los mismos [75].

Sin embargo, otros autores postulan que las bacterias resistentes son capaces de evolucionar y adaptarse para compensar la pérdida de fitness inicial. Según esta hipótesis, el coste biológico asociado a la multirresistencia se vería aminorado mediante mecanismos de compensación secundarios que consiguen restaurar el fitness inicial de la bacteria sin perder resistencia [23,

24, 76-79]. Entre los procesos que sugieren la reversión del coste biológico de la bacteria resistente se encuentran la evolución compensatoria, mutaciones sin coste y la co-selección genética [23, 24]. La evolución compensatoria, vendría dada por la aparición de **mutaciones compensatorias** que son mutaciones adicionales que restauran o sustituyen por una vía alternativa las funciones que habían sido alteradas por la mutación de resistencia [80, 81]; de forma que la bacteria recupera su fitness inicial manteniendo su perfil de resistencia [23, 76]. En segundo lugar, aunque menos frecuente, sería la aparición de **mutaciones de resistencia libres de coste biológico** [23, 24, 82-84]. Por último, la **co-selección genética**, implicaría la vinculación genética de un gen de resistencia a otro marcador genético, de forma que aunque el gen asociado a la mutación de resistencia pudiera conferir un coste, este se vería compensado por la asociación a otro marcador genético que ralentizara la aparición del coste biológico [23, 24].

En relación a la infección por *P. aeruginosa*; la posible relación entre la multirresistencia y una menor virulencia sigue siendo controvertida. Aunque varios autores apoyan la existencia de un coste biológico asociado a la multirresistencia [74, 85-89] otros la rechazan [70, 81, 90] o incluso sugieren que determinados mecanismos de resistencia pueden acompañarse de un aumento del fitness bacteriano [91].

4. Impacto Clínico de la Multirresistencia.

A pesar de este aumento de cepas resistentes producido en las últimas décadas [84, 92-93], el impacto de la multirresistencia en el pronóstico de los pacientes sigue siendo un tema controvertido [84, 94].

En general, se asume que las infecciones producidas por microorganismos multirresistentes están asociadas a un peor pronóstico. Diversos estudios clínicos han identificado una asociación entre resistencia y una mayor frecuencia de factores pronósticos adversos, tales como mayor mortalidad, mayor estancia hospitalaria o mayor coste sanitario [84, 92-93, 95-98]. Sin embargo, la contribución de una posible mayor virulencia del patógeno versus de otros factores relacionados con la multirresistencia, pero independientes del patógeno, no está clarificada ya que los estudios al respecto presentan sesgos diversos (diseños retrospectivos, diferencias en la población de estudio, definiciones aleatorias de multirresistencia...), que impiden sacar conclusiones definitivas [84, 92, 94]. Y lo que es más importante, el pronóstico de la infección viene determinado no sólo por factores dependientes del microorganismo (carga o inóculo bacteriano, virulencia...) sino por factores dependientes del huésped (edad, enfermedades subyacentes, inmunidad...) y del tratamiento (precocidad de administración e idoneidad) [98]. Así, los pacientes con infecciones debidas a microorganismos multirresistentes suelen presentar más comorbilidad, lo que puede condicionar una mayor mortalidad [98]. Además, reciben con más frecuencia un tratamiento empírico inapropiado [84, 92, 98-99], lo que también puede influir en el pronóstico [84, 100-101]. Estudios previos sugieren que dichos factores (severidad de las enfermedades subyacentes, retraso del tratamiento efectivo) pueden ser más decisivos que la virulencia del patógeno por sí misma [84, 94, 98, 102].

Hasta la fecha ningún estudio ha demostrado que el peor pronóstico de los pacientes con infección multirresistente sea debido a la multirresistencia del patógeno en sí mismo, con la única excepción del SARM comunitario [98]. De hecho, varios estudios sugieren que la multirresistencia *per se* no se asocia a una mayor mortalidad cuando se administra un tratamiento definitivo adecuado [29-30, 93-94, 103-107].

En relación a la infección por *P. aeruginosa*, varios estudios han intentado analizar el impacto negativo que la multirresistencia pudiera tener sobre el pronóstico de los pacientes. Algunos autores han observado una asociación entre mortalidad y multirresistencia [95, 108-110], pero sin profundizar en una relación causal entre ambos. Por el contrario, varios estudios han demostrado que la mortalidad en infecciones por *P. aeruginosa* multirresistente es similar a la provocada por *P. aeruginosa* no multirresistente [29, 93, 103, 105-106], a pesar de recibir las cepas resistentes un tratamiento inadecuado con mayor frecuencia, lo que sugeriría de forma indirecta una mayor virulencia de las cepas sensibles [29, 106].

Por lo tanto, la cuestión sobre las consecuencias clínicas de la multirresistencia, más concretamente la repercusión en la mortalidad, permanece sin respuesta. Desde un punto de vista práctico este aspecto es de gran importancia para guiar el diseño de las políticas antibióticas y estrategias de control de infecciones multirresistentes [44]. Dadas las dificultades que conlleva el análisis de este problema desde un punto de vista exclusivamente clínico, la utilización de investigación experimental será de gran utilidad.

5. Respuesta inflamatoria a la infección.

5.1. Sepsis y respuesta inflamatoria a la infección.

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) define la respuesta generalizada del huésped ante una variedad de estímulos como son la infección, el trauma, la isquemia, la reperfusión, quemaduras, cirugías o procesos inflamatorios estériles (como la pancreatitis) [111-112]. El concepto de sepsis implica que esta respuesta se produce como consecuencia de un patógeno infeccioso y, dentro de esta, se puede definir un espectro continuo de gravedad (sepsis, sepsis grave, shock séptico y fallo multiorgánico) [111-113].

La sepsis se produce como resultado de la activación del sistema inmune ante la infección y conlleva una compleja respuesta inflamatoria, en la que se secretan de forma simultánea factores pro-inflamatorias y anti-inflamatorias desde las fases más precoces de la infección [114-116]. Inicialmente, la activación de las células epiteliales, neutrófilos, macrófagos y linfocitos lleva a la producción de una serie de interleuquinas (IL) pro-inflamatorias, entre las que se encuentran el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $-\alpha$), IL-1 β , IL-6, o la IL-8. Simultáneamente, se activa el sistema complemento, el sistema de coagulación y aumenta la concentración sérica de proteínas de fase aguda [112, 114]. Las citoquinas anti-inflamatorias, entre las que destaca la IL-10 o la IL-13, tienen como objetivo compensar una respuesta pro-inflamatoria exagerada. Es necesario mantener un equilibrio entre la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria. Así, la cascada pro-inflamatoria permite la eliminación del patógeno infeccioso pero en exceso puede conducir a daño tisular local o a toxicidad sistémica (shock séptico, fallo multiorgánico). Por el contrario, los mediadores anti-inflamatorios reducen el daño tisular y la toxicidad sistémica, pero en exceso pueden impedir una correcta eliminación de la bacteria o llevar a un estado de inmunodepresión [114, 117].

A pesar de que tanto las citoquinas pro-inflamatorias como las anti-inflamatorias aparecen de forma precoz en la sepsis [114-116]; en general se asume que durante la fase inicial prevalece una respuesta hiperinflamatoria en la que predominan las interleuquinas pro-inflamatorias y que más tardíamente una fase de hiporrespuesta o inmunodepresión en la que predomina la respuesta anti-inflamatoria [114]. Actualmente, la hipótesis más extendida sobre la patogenia de la sepsis es la teoría de la respuesta inmune [111-112, 116, 118]. Según esta hipótesis el patrón de respuesta inflamatoria en la sepsis depende de factores dependientes del huésped (edad, comorbilidad...) y del microorganismo (virulencia, carga bacteriana...), siendo las características del huésped fundamentales para definir la intensidad y el patrón de inflamación. Así según esta teoría, en un paciente joven e inmunocompetente, se producirá una primera fase de respuesta inflamatoria extrema que podrá llevar a shock, fallo multiorgánico y a una mortalidad precoz, pero que si se supera se continuará de un periodo corto de respuesta anti-inflamatoria con una recuperación posterior. Sin embargo, en el caso de pacientes longevos o inmunodeprimidos la respuesta hiperinflamatoria será menos intensa, incluso pudiendo faltar signos de sepsis, mientras que el periodo hipo-inflamatorio será prolongado conduciendo a un periodo de inmunosupresión (inmunoparálisis o anergia inmune) en el que la falta de respuesta del sistema inmune del huésped puede llevar a una mortalidad tardía o a una mayor susceptibilidad a las infecciones oportunistas [114].

5.2. Interleuquinas y principales biomarcadores en la infección.

Las interleuquinas son proteínas de bajo peso molecular que coordinan una serie de reacciones inflamatorias a nivel tisular, incluyendo la inflamación, crecimiento celular, diferenciación y reparación [114]. En la sepsis, las interleuquinas son los mensajeros moleculares que inician la respuesta inflamatoria y definen su magnitud.

) **TNF- α** , es fundamental en la respuesta inicial frente al patógeno siendo una de las primeras citoquinas que aparecen en el torrente sanguíneo [114, 118]. Su efecto pro-inflamatorio viene dado por funciones como la activación del endotelio vascular para favorecer su permeabilidad, la inducción de la óxido nítrico sintetasa con la consecuente vasodilatación y reclutamiento de las células inflamatorias, factores humorales y de complemento. Además es el principal inductor de numerosos mediadores inflamatorios, incluyendo otras interleuquinas (IL-6, IL-8, IL-10...) y estimula la activación y adhesión plaquetaria [119-120]. Todo ello tiene un efecto inicial positivo al facilitar la respuesta inflamatoria frente a la infección; sin embargo un exceso de TNF- α puede desencadenar colapso vascular, fallo multiorgánico y shock séptico [117, 121].

) **IL-6** es una citoquina pro-inflamatoria que aparece precozmente ante la infección y que induce la síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado [122, 123], la producción de otras interleuquinas e interviene en la trombopoyesis y en la activación de las cascadas de coagulación. Su principal estímulo es el TNF- α [123]. Es un biomarcador que podría ser de utilidad para predecir el pronóstico de los pacientes con sepsis [111].

) **IL-10** es la principal interleuquina antiinflamatoria cuya función es amortiguar el exceso de inflamación que pudiera ser nocivo para el huésped, es decir, la IL-10 contrarregula la acción pro-inflamatoria para limitar el daño tisular [114, 120, 124]. La secreción de IL-10

está mediada por múltiples interleuquinas pro-inflamatorias entre ellas, el TNF- α y la IL-6 [124]. Su acción anti-inflamatoria viene dada por su capacidad de inhibir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y de regular la actividad de los macrófagos, del sistema mayor de histocompatibilidad tipo II y la respuesta humoral [114, 124-125].

La **procalcitonina**, es la pro-hormona de la calcitonina cuya producción está regulada por el gen CACL-1 del cromosoma 11 [126-127]. En ausencia de infección, la transcripción de este gen queda limitada a las células neuroendocrinas del tiroides (células C) y del pulmón; pero ante una infección la expresión de este gen aumenta en otros tejidos con lo que aumenta la producción de procalcitonina [127-129]. La procalcitonina es un marcador de gran utilidad para el diagnóstico de la sepsis. Entre sus ventajas se encuentra que aparece de forma precoz y se mantiene en plasma de forma más prolongada que las interleuquinas. Sus niveles se correlacionan con la gravedad de la infección y con el pronóstico [126-128]. No se eleva en infecciones víricas [128, 130]; pero sí en situaciones de respuesta inflamatoria sistémica (grandes quemados, pancreatitis, politraumatismos...) [127-128]. A pesar de su utilidad como marcador, su papel fisiopatológico en la sepsis todavía es desconocido, se cree que es un importante mediador en la cascada de la sepsis pero su función no es clara [127-128].

La **Proteína C reactiva (PCR)** es un reactante de fase aguda que se produce en el hígado tras el estímulo de diferentes citoquinas, principalmente la IL-6 [115, 131]. Tiene acción tanto pro-inflamatoria (reconocimiento, adhesión y eliminación del patógeno) como anti-inflamatorias (inhibe la adhesión de neutrófilos al endotelio o antagoniza a la IL-1) [115]. A pesar de que se ha utilizado como marcador de infección durante años, su especificidad es baja [115, 131].

5.3. Patogénesis de la infección por *P. aeruginosa* y respuesta inmune del huésped.

P. aeruginosa se comporta como patógeno oportunista, siendo rara la infección en individuos sanos. En la infección por *P. aeruginosa* es fundamental la respuesta de la inmunidad innata [4, 7]. Se consideran factores de riesgo al desarrollo de infección por *P. aeruginosa* aquellos que comprometen la integridad de la barrera mecánica epitelial (ventilación mecánica, grandes quemados, mucositis secundaria a quimioterapia...) o defectos en la inmunidad innata (neutropenia, pacientes trasplantados, oncológicos o con VIH), siendo los más vulnerables los pacientes neutropénicos. En el caso de las infecciones respiratorias crónicas hay que hacer especial mención a la fibrosis quística, ya que *P. aeruginosa* tiene un papel fundamental en su patogenia al favorecer la destrucción tisular respiratoria [132].

El compromiso de la función de barrera epitelial y la pérdida de la inmunidad local predisponen a la infección por *P. aeruginosa*. Frecuentemente, como consecuencia de maniobras diagnósticas y terapéuticas (uso de catéteres endovenosos, sondajes vesicales, tubos endotraqueales), se produce una rotura de la integridad de la piel y mucosas que facilita la adherencia de *P. aeruginosa* a las células del huésped y su colonización [7]. Una vez que las barreras mecánicas epiteliales o endoteliales se rompen, el sistema inmune innato desencadena la primera línea de defensa con un reclutamiento masivo de neutrófilos que tienen como función eliminar la bacteria mediante secreción de proteasas con acción bactericida y activar la cascada inflamatoria [4, 6-7]. Otras células del sistema inmune innato, como los macrófagos y las células dendríticas, participan en esta respuesta mediante la fagocitosis bacteriana o la presentación del antígeno para el posterior reconocimiento por los linfocitos T que activan a los linfocitos B que liberarán anticuerpos específicos al antígeno presentado [4, 7].

6. Modelos animales de infección experimental

6.1. Utilidad y aplicaciones de los modelos de experimentación animal.

Los modelos animales son un eslabón fundamental entre los estudios *in vitro* y los estudios clínicos. Los estudios *in vitro* reproducen partes de organismos biológicos más complejos y presentan la incuestionable ventaja de poder obtener información de forma relativamente rápida y reproducible. A pesar de su utilidad, hay que ser cautelosos al trasladar la información obtenida de estos estudios al ser humano. En muchas ocasiones los aspectos clínicos no pueden ser reproducidos de forma adecuada mediante modelos *in vitro*. Es entonces cuando la utilización de un modelo experimental animal posee un valor excepcional; siendo la finalidad última de estos modelos la de intentar dar respuesta a problemas que surgen de la práctica clínica habitual.

Históricamente, los modelos animales han contribuido al conocimiento de la patogénesis de muchas enfermedades y también al desarrollo de estrategias terapéuticas para su tratamiento. Si se revisan los avances logrados en las ciencias biomédicas durante los últimos 100 años, puede comprobarse que la mayoría necesitaron el estudio de algún modelo *in vivo*. De hecho, se estima que la experimentación animal ha contribuido a aumentar en 25 años la esperanza de vida humana de 1900 a 1990 [133].

Todo modelo experimental *in vivo* parte de la premisa de que es necesario una suficiente similitud entre el hombre y los animales de experimentación para que los resultados sean extrapolables. Las bases biológicas que justifican el uso de animales de experimentación, vienen derivadas de la teoría de la evolución y de universalidad del código genético, que hace que todos los animales vertebrados seamos biológicamente semejantes. Así por ejemplo, los ratones comparten hasta el 97.5% del ADN con los humanos y por lo tanto, la mayoría de las

vías metabólicas, reacciones inmunológicas, enfermedades espontáneas o susceptibilidad a sustancias tóxicas son semejantes para ambas especies.

Los modelos animales presentan ventajas metodológicas incuestionables como su reproducibilidad, la posibilidad de utilizar grupos homogéneos, de estudiar las variables en función de los objetivos o de adaptar el número de animales al diseño estadístico para conseguir resultados estadísticamente significativos. Los resultados obtenidos en estos modelos experimentales sirven de aproximación y guía para la investigación clínica, pero no permiten establecer una extrapolación directa a la infección humana

Los roedores, fundamentalmente el ratón, son los animales de experimentación más usados, suponiendo el 90% de los mismos [134]. Las ventajas del ratón sobre otros animales experimentales incluyen el que se trata de un animal pequeño, manejable, su proximidad genética con el ser humano, el ser genéticamente modificable y poseer una biología bien caracterizada. Como ventajas añadidas, su mantenimiento es sencillo y su ciclo reproductivo es corto con camadas grandes, siendo relativamente barato comparado con otros animales de experimentación [135].

6.2. Aspectos éticos del uso de modelos de experimentación animal .

La investigación en modelos animales debe ir siempre asociada al cumplimiento de unas normas éticas. Antes de iniciar cualquier procedimiento *in vivo*, es fundamental plantearse el balance ético de dicha experimentación, valorando el coste-beneficio de la utilización de animales con fines de investigación. Por un lado, se tendrá en cuenta los beneficios científico-médicos derivados del procedimiento y por otro las consecuencias sobre los animales, y si éstas están justificadas por los potenciales beneficios derivados de la investigación. Cualquier experimentación animal debe seguir el **principio de las 3 Rs** [136-137] que consiste en:

- Ñ **Reemplazar** o sustituir el uso de los animales por otros procedimientos, limitando su empleo cuando existan técnicas alternativas disponibles como podrían ser modelos *in vitro* (cultivos celulares...), modelos matemáticos o simulaciones por ordenador.

- Ñ **Reducir**, cuyo objetivo es obtener la información necesaria con el menor número de animales posible, intentando obtener la mayor rentabilidad por animal. Para ello es fundamental realizar un esfuerzo inicial en el diseño estadístico y en la estandarización del procedimiento y también, en el control de las condiciones ambientales y de los animales para disminuir la variabilidad del procedimiento.

- Ñ **Refinar**: Implica una mejora en el cuidado de los animales para prevenir sufrimiento, y malestar innecesario. Esto supone reconocer los signos de dolor y estrés del animal para poder realizar maniobras encaminadas a paliarlos (anestesia, analgesia y eutanasia).

6.3. Modelo de infección experimental de peritonitis en ratón.

El modelo de peritonitis en ratón es una extensión del modelo de septicemia, descrito con anterioridad por Fridmodt-Moller N et al, [138-139]. Ambos son considerados modelos de cribado, que se utilizan generalmente como primer test *in vivo*. Es un modelo sencillo y rentable, que utiliza como variable principal la mortalidad/supervivencia por lo que es útil para la realización de estudios inmunológicos y de patogenia. Su principal limitación estriba en que sus resultados son muy dependientes del tamaño del inóculo y la infección suele ser de curso más rápido que en la infección humana. Por ello se considera un modelo útil, pero poco afinado, si bien puede aumentarse su precisión incorporando el estudio de otras variables, como el recuento bacteriano y leucocitario en el líquido peritoneal, estudio de bacteriemia, estudios inmunológicos [138]...

El modelo de peritonitis en ratón ha sido utilizado ampliamente, encontrándose entre sus aplicaciones estudios de patogénesis de infección, de respuesta inmunitaria, de evaluación antibiotica (eficacia farmacológica, farmacodinámica, interacción entre fármacos...) [139]. Este modelo ha sido utilizado previamente en nuestro laboratorio con microorganismos diferentes de *P.aeruginosa* [140-141], y ampliamente utilizado por otros grupos para la investigación de *P. aeruginosa* [142-143] y para estudiar la relación entre patrón de resistencia y virulencia con otras bacterias [144-146].

6.4. Justificación de uso del procedimiento de experimentación animal

La utilización de un modelo animal en nuestro estudio surgió ante la necesidad de profundizar en la fisiopatología de la infección por *P. aeruginosa*, más concretamente, en el estudio del posible coste biológico asociado a la multirresistencia. La hipotética confirmación de una menor virulencia de las cepas multirresistentes podría tener un impacto importante en la práctica clínica habitual, principalmente en lo referente a las pautas de política antibiótica empírica en nuestras UCIs.

Los estudios clínicos encaminados a responder dicha pregunta, tropezaron con la dificultad de conseguir muestras clínicas suficientemente grandes para alcanzar la significación estadística. Por otra parte, la investigación clínica de la respuesta inflamatoria se veía artefactada por las diferencias en las características de los pacientes (edad, comorbilidad, inmunodeficiencias, uso de tratamientos inmunosupresores...) que podían influir en la respuesta inmune a la infección. Además, no era posible controlar con exactitud el momento de inicio de la infección y consecuentemente, en qué momento exacto se estaba cuantificando la respuesta inflamatoria.

La utilización de un modelo experimental animal permitió conseguir grupos homogéneos, tanto desde el punto de vista somático (misma edad, peso, sexo, genética) como unas mismas condiciones de estabulación, en los que la respuesta inflamatoria no estaba influida por factores dependientes del huésped (todos los ratones eran inmunocompetentes). Además, este modelo permitió controlar con exactitud los puntos horarios en el que se realizaban las determinaciones de los marcadores de inflamación y de los otros parámetros analizados, asegurando que las comparaciones entre los grupos fueran en el mismo momento de la infección.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Como se ha expuesto en el capítulo de la Introducción del presente proyecto de Tesis Doctoral, la resistencia antimicrobiana es una de las principales preocupaciones de la medicina actual, ya que el incremento de infecciones por patógenos multirresistentes de las últimas décadas conlleva grandes dificultades en el manejo clínico de los pacientes. Entre ellas las infecciones por *P. aeruginosa* constituyen uno de los principales problemas. La aparición de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes limita las opciones terapéuticas efectivas y plantea además la necesidad imperiosa de desarrollar estrategias de control de infección para impedir su diseminación. Para ello, el uso racional y prudente de los antibióticos existentes es fundamental, así como el mejor conocimiento epidemiológico posible de estas infecciones.

El escaso arsenal terapéutico disponible para el manejo de las infecciones por *P. aeruginosa* multirresistentes obliga a un uso responsable de los pocos fármacos activos frente a estas infecciones para evitar la aparición de resistencias a los mismos. En este sentido, uno de los grandes dilemas que se plantea es la conveniencia de ampliar la cobertura antimicrobiana empírica de manera sistémica, incluyendo fármacos con actividad frente a cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes (polimixinas o aminoglucósidos) a todos los pacientes de la UCI afectados de infecciones graves. Mientras la aplicación de esta estrategia garantizaría un tratamiento empírico adecuado a la mayoría de los pacientes, también podría acompañarse de consecuencias deletéreas que tienen que ser sopesadas. En primer lugar, comportaría un potencial riesgo de aparición de los efectos secundarios de estos fármacos (nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad...) en los pacientes. Hay que tener en cuenta que la población de pacientes susceptibles de presentar infección por *P. aeruginosa* multirresistentes es especialmente vulnerables a estas toxicidades debido a su comorbilidad y gravedad. En segundo lugar, este tipo de estrategias conducirían a un exceso de presión antimicrobiana selectiva que podría condicionar a medio o largo plazo la aparición de resistencias a estos fármacos, que son el último reducto actualmente disponible para tratar estas infecciones.

Finalmente, muchos fármacos usados para el tratamiento de patógenos resistentes podrían ser menos efectivos que los utilizados para cepas sensibles, como se ha demostrado que ocurre con el *S. aureus*.

En este contexto, un aspecto de gran importancia es el supuesto coste biológico que podría acompañar el desarrollo de la multirresistencia microbiana, condicionando una disminución de la virulencia del patógeno y de sus efectos deletéreos sobre el huésped. Este supuesto sugerido por diversos autores y nuestra experiencia clínica previa, podría relativizar la necesidad de utilizar de forma empírica y sistemática los fármacos de última línea terapéutica y diseñar políticas antibióticas específicas dirigidas a determinados grupos de riesgo. La clarificación de la problemática planteada es muy relevante, pero requiere de estudios clínico-epidemiológico sofisticados bien diseñados y randomizados de difícil realización, amén de la aportación complementaria de la investigación experimental.

El grupo de trabajo de “Infecciones de difícil tratamiento” del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Bellvitge tiene una dilatada experiencia en el manejo clínico y epidemiológico de las infecciones nosocomiales y en concreto de las infecciones por *P.aeruginosa* multirresistentes, así como en el ámbito de su investigación. Desde hace más de una década forma parte de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa y ha participado en diversos estudios multicéntricos sobre el tema. En los años precedentes al presente proyecto de investigación se desarrolló en el seno de este grupo, la Tesis Doctoral “*Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos: epidemiología e impacto clínico.” Por la Dra. Cristina Suárez. Asimismo, dispone de una amplia experiencia en la realización de estudios de experimentación animal como soporte a la investigación clínica de las enfermedades infecciosas.

Es en este marco en el que surge el presente proyecto de investigación, realizado durante el período 2012-2016, como una continuación de la experiencia previa. Desde el punto de vista conceptual está dividido en dos grandes partes; la primera parte contiene un grupo de trabajos llevados a cabo para describir aspectos epidemiológicos de *P. aeruginosa* potencialmente útiles para el manejo de estas infecciones; la segunda parte contiene una serie de trabajos cuyo objetivo fundamental es evaluar el impacto de la resistencia en la patogenicidad y virulencia de *P. aeruginosa*. Desde el punto de vista metodológico, se incluyen estudios clínico-epidemiológicos, experimentales *in vitro* y experimentales *in vivo*. Globalmente, se intenta dar respuesta a una pregunta surgida de la práctica clínica habitual mediante una investigación traslacional que incluye una aproximación epidemiológica, clínica y experimental.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La **hipótesis fundamental** fue que la adquisición de resistencia por parte de *P. aeruginosa* se podría asociar a un coste biológico que conllevaría una menor virulencia. Esto implicaría una menor patogenicidad de las cepas multirresistentes respecto de las no multirresistentes.

En torno a esta hipótesis central se plantearon una serie de **hipótesis específicas**:

A. Hipótesis relacionadas con el comportamiento epidemiológico de *P. aeruginosa*:

1. La dinámica de colonización intestinal por *P. aeruginosa* podría ser diferente en función del perfil de resistencia de las cepas de *P. aeruginosa*.
2. La colonización intestinal por *P. aeruginosa* precede el desarrollo de infección y podría ser útil como predictor de infección por *P. aeruginosa*.
3. La exposición a antibióticos puede ser un factor de riesgo determinante para la colonización e infección por cepas de *P. aeruginosa* multirresistente.

B. Hipótesis relacionadas con la influencia de la resistencia antibiótica en la patogenicidad y virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*:

1. Las cepas multirresistente tendrán una menor invasividad clínica, entendida como una menor capacidad de producir infección, que las cepas no multirresistentes.
2. Las cepas de *P. aeruginosa* multirresistente podrían tener una capacidad patogénica clínica diferente que las no multirresistentes, lo que supondría diferencias en la capacidad de producir respuesta inflamatoria, en el pronóstico y en la mortalidad.
3. Las cepas multirresistentes podrían expresar diferentes determinantes de virulencia que las cepas no multirresistentes en modelos experimentales *in vitro*.
4. La adquisición de resistencia podría condicionar una menor patogenicidad de *P. aeruginosa* en modelos experimentales *in vivo*, lo que se asociaría a una menor capacidad de producir infección, menor respuesta inflamatoria y menor mortalidad.

OBJETIVOS

A. Estudiar el comportamiento epidemiológico de *P. aeruginosa*.

Objetivo 1. Describir la dinámica de colonización intestinal de *P. aeruginosa* en pacientes críticos en función del fenotipo de resistencia antibiótica.

Objetivo 2. Analizar el impacto de la colonización intestinal por *P. aeruginosa* en el desarrollo posterior de infección: evaluar el posible valor de la colonización intestinal como predictor de infección por *P. aeruginosa*.

Objetivo 3. Determinar el impacto de la exposición a antibióticos en la colonización e infección por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes y extremadamente resistentes.

B. Determinar la patogenicidad y virulencia clínica de *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia antimicrobiana.**B1. Invasividad clínica o capacidad de producir infección.**

Objetivo 4. Evaluar la influencia de la multirresistencia en la capacidad de producir infección por *P. aeruginosa*.

B2. Capacidad de producir respuesta inflamatoria.

Objetivo 5. Analizar la respuesta inflamatoria clínica y molecular de pacientes con infección por *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia.

B3. Letalidad.

Objetivo 6. Estudiar el impacto de la multirresistencia en el pronóstico de neumonías asociadas a ventilación mecánica.

Objetivo 7. Investigar la influencia del genotipo de secreción tipo III (SSTT) y del patrón de resistencia en la mortalidad de las infecciones bacteriémicas por *P. aeruginosa*.

C. Determinar la patogenicidad y virulencia *in vitro* de *P. aeruginosa* en función de su patrón de resistencia.

Objetivo 8. Estudiar los principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* y evaluar su expresión en función del perfil de resistencia antibiótica.

D. Determinar la patogenicidad y virulencia *in vivo* de *P. aeruginosa* mediante un modelo experimentación animal.

Objetivo 9. Estudiar el impacto de la multirresistencia de *P. aeruginosa* en la capacidad de producir mortalidad en un modelo experimental animal.

Objetivo 10. Analizar el impacto de la multirresistencia de *P. aeruginosa* en la capacidad de producir enfermedad y respuesta inflamatoria en un modelo experimental animal.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Investigación clínica.

1.1. Ámbito de estudio

1.1.1. Hospital Universitari de Bellvitge.

Todos los estudios clínicos se han llevado a cabo en el Hospital Universitario de Bellvitge, hospital universitario de tercer nivel situado en el área metropolitana sur de Barcelona. Cuenta con una gran variedad de especialidades médicas y quirúrgicas lo que permite atender patología de alta complejidad, siendo el centro de referencia de un millón de habitantes.

El hospital dispone de tres unidades de cuidados intensivos (UCI), dos de ellas dedicadas a patología aguda médico-quirúrgica, incluyendo postoperatorio inmediato de trasplante de órganos sólidos. La otra unidad está destinada a pacientes procedentes de las otras dos unidades una vez estabilizados de la patología aguda. Cada unidad dispone de 12 camas individuales, siendo la razón de enfermería-paciente de 1:2. Los estudios prospectivos fueron realizado en una de las unidades de UCI de agudos.

En relación a la patología infecciosa, en nuestro centro se realiza diariamente una reunión conjunta en la que participan facultativos de los Servicios de Microbiología, Enfermedades Infecciosas, Medicina Preventiva y Farmacia. En estas sesiones los microbiólogos proporcionan los resultados de los hemocultivos y de las muestras clínicas estériles del día e informan de los microorganismos relevantes desde el punto de vista del control de la infección nosocomial. Estas sesiones de trabajo favorecen la relación entre los diferentes especialistas implicados en la infección y permiten un trato multidisciplinar de los pacientes. Gracias a estas reuniones, se pudo garantizar un diagnóstico precoz de las infecciones por *P. aeruginosa*.

1.1.2. Red Española de Investigación de Patología Infecciosa (REIPI).

El estudio multicéntrico presentado en esta tesis se realizó en el marco de la Red Española de Investigación de Patología Infecciosa (REIPI), dentro del grupo de trabajo "Resistencia, virulencia y diseminación epidémica: impacto clínico". En esta red participan dieciséis centros nacionales de investigación especializados en la patología infecciosa, entre los que se encuentra el Hospital Universitari de Bellvitge.

1.2. Diseño de los estudios

Esta tesis se inició con la realización de dos estudios clínicos de carácter retrospectivo. Los resultados de estos trabajos junto con la experiencia previa de nuestro centro, hicieron plantearnos una serie de dudas científicas que se intentan responder mediante un estudio clínico observacional prospectivo, un estudio multicéntrico y mediante los estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* que se incluyen en esta tesis. Por lo tanto, la investigación clínica de esta tesis comprende: dos estudios retrospectivos, tres estudios prospectivos realizados a partir de una cohorte observacional y un estudio multicéntrico prospectivo.

1.2.1. Diseño de los estudios retrospectivos:

En el primer trabajo, **artículo 3**, se analizaron de forma retrospectiva los episodios de bacteriemia por *P. aeruginosa* diagnosticados en nuestro hospital durante los años 2006 y 2007 (formulario utilizado se muestra en el **Anexo II.b**). Concomitantemente, se evaluaron todos los pacientes con algún aislamiento clínico con *P. aeruginosa* durante su ingreso en el mismo periodo. Los objetivos fueron estudiar los factores asociados a desarrollar bacteriemia por *P. aeruginosa* extremadamente resistente y valorar las diferencias en la capacidad de desarrollar bacteriemia en función de su perfil de resistencia.

La capacidad de producir bacteriemia se calculó como la proporción de bacteriemias producidas por *P. aeruginosa* con un patrón de resistencia determinado entre los pacientes colonizados o infectados por cepas con dicho patrón de resistencia.

$$\text{Capacidad de producir bacteriemia} = \frac{\text{Nº bacteriemias } P. \textit{ aeruginosa} \text{ con patrón resistencia X}}{\text{Nº pacientes con aislamiento clínico por } P. \textit{ aeruginosa} \text{ con patrón de resistencia X}}$$

En cuanto al segundo trabajo, **artículo 5**, se recogieron retrospectivamente los pacientes con episodios de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV) ocurridos en nuestro centro en el periodo comprendido entre el 2006 y 2011 (el formulario utilizado está recogido en el **Anexo II.c**). Se compararon las características epidemiológicas y variables pronósticas de las NAV producidas por *P. aeruginosa* multirresistente con aquellas causadas por cepas sensibles.

1.2.1. Diseño de los estudios prospectivos:

Los **artículos 1, 2 y 4** se realizaron a partir de un estudio observacional prospectivo de cohortes. La recogida de datos clínicos se realizó durante un periodo de 18 meses (enero del 2012 a julio del 2013). Se incluyeron a todos los pacientes ingresados en la unidad de UCI durante más de 48 horas.

Se desarrolló un estudio de vigilancia activa de colonización intestinal por *P. aeruginosa* mediante la realización de un frotis rectal al ingreso en la UCI y de forma semanal hasta el alta de dicha unidad con el fin de conocer el estado de colonización intestinal por *P. aeruginosa* de los pacientes. A la vez, se realizó una monitorización clínica diaria desde el ingreso en la UCI hasta el alta hospitalaria con el fin de identificar de forma precoz los episodios de infección por *P. aeruginosa*. En los casos de infección por *P. aeruginosa*, se realizó una extracción sanguínea para la determinación sérica de los parámetros inflamatorios al momento del diagnóstico de la infección y a las 48 horas de la misma y se procedía a la monitorización de la respuesta inflamatoria clínica. Los formularios utilizados se encuentran en el **Anexo II.a**.

Para analizar la presión antibiótica se revisó diariamente la antibioticoterapia recibida por cada uno de los pacientes desde su ingreso hasta el alta hospitalaria. También se cuantificaron los antibióticos recibidos por cada paciente en los tres últimos meses previos al ingreso. De

esta forma, se pudo registrar el número de días de cada antibiótico para cada paciente, que se agruparon posteriormente por familias de antibiótico tal y como se muestra en el **Anexo II.a**.

Las características del diseño de este estudio, nos permitieron analizar los siguientes puntos:

-) Describir la **dinámica de colonización intestinal** de *P. aeruginosa* en pacientes críticos.
-) Evaluar el posible valor de **colonización intestinal** como predictor del desarrollo posterior de una infección por *P. aeruginosa*
-) Determinar el impacto de la **exposición previa a antibióticos** para el desarrollo de colonización intestinal por *P. aeruginosa* multirresistente.
-) Analizar las diferencias en la **capacidad invasiva** de *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia antibiótica, midiendo la precocidad con la que desarrollaban infección pacientes previamente colonizados por *P. aeruginosa*.
-) Determinar las diferencias en la **respuesta inflamatoria** desencadenada por la infección por *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia.

El **artículo 6** se realizó mediante un análisis post hoc de una cohorte multicéntrica de pacientes con bacteriemias por *P. aeruginosa* recogidas prospectivamente (**Anexo II.b**). En el estudio participaron 10 hospitales españoles. Se incluyeron de forma prospectiva los episodios de bacteriemia monomicrobiana por *P. aeruginosa* notificados en dichos centros durante los años 2008 y 2009. Los pacientes fueron monitorizados durante los 30 días posteriores a la bacteriemia y se evaluó la mortalidad precoz y tardía. En los aislamientos de *P. aeruginosa* de dicha cohorte se investigaron los genotipos del sistema de secreción tipo III y se realizaron estudios genotípicos con MLST para analizar la diseminación clonal de las cepas. Con los datos previos, se estudió la asociación del sistema de secreción tipo III con la mortalidad y con el perfil de resistencia de *P. aeruginosa*; y la asociación perfil de resistencia con la mortalidad precoz y tardía en la bacteriemia por *P. aeruginosa*.

1.3. Definiciones

1.3.1. Multirresistencia.

Los diferentes fenotipos de *P. aeruginosa* se estratificaron según su patrón de resistencia antibiótica siguiendo los criterios actuales para definir multirresistencia [147]. Se consideró:

Ñ ***P. aeruginosa* multirresistente (MDR)**: cepa resistente a uno o más antibióticos en tres o más familias de antibióticos antipseudomónicos.

Ñ ***P. aeruginosa* extremadamente resistente (XDR)**: cepa resistente a al menos un antibiótico de todas las familias de fármacos antipseudomónicos excepto en dos o menos familias. Por lo tanto, las cepas de *P. aeruginosa* XDR están incluidas dentro de la categoría de *P. aeruginosa* MDR, que se divide en *P. aeruginosa* XDR y MDR no-XDR.

Ñ ***P. aeruginosa* no-multirresistente (no-MDR)**: Incluía tanto las cepas salvajes o sensibles a todos los fármacos antipseudomónicos testados (que se denominaron multiS) como las cepas con resistencia a uno o más fármacos en una o dos familias de antibióticos antipseudomónicos (que se consideraron moderadamente resistentes).

En la **tabla 3** se estratifican las diferentes familias de antibióticos antipseudomónicos.

Tabla 3. Clasificación de las familias de fármacos con actividad antipseudomónica.

Familias de fármacos antipseudomónicos	Antibióticos
Aminoglicósidos	Gentamicina, Tobramicina, Amikacina
Carbapenémicos antipseudomónicos	Imipenem, Meropenem, Doripenem
Penicilina antipseudomónica	Piperacilina, Ticarcilina, Piperacilina-tazobactam
Cefalosporinas antipseudomónicas	Ceftazidima, Cefepime
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino, Levofloxacino
Ácidos fosfónicos	Fosfomicina
Monobactam	Aztreonam
Polimixinas	Colistina, Polimixina B

1.3.2. Patogenicidad y virulencia.

) La **patogenicidad** fue definida como la capacidad de *P. aeruginosa* de infectar (invadir y multiplicarse en el huésped) y de producir enfermedad. A nivel clínico, la patogenicidad de *P. aeruginosa* fue medida por la invasividad clínica, o la capacidad de desarrollar infección en pacientes previamente colonizados. En el modelo animal la patogenicidad vino determinada por la capacidad de producir infección local (peritonitis) y diseminada (bacteriemia).

) La **virulencia** se definió como la capacidad de *P. aeruginosa* de provocar enfermedad en el huésped valorando el grado de daño producido. En el estudio clínico y en el modelo animal la virulencia fue medida por la capacidad de producir respuesta inflamatoria y letalidad. En los estudios *in vitro* mediante diferentes determinantes microbiológicos asociados a la virulencia.

1.3.3. Colonización intestinal.

La colonización intestinal por *P. aeruginosa* se definió en base al aislamiento de *P. aeruginosa* en una o más muestras rectales. Se consideró colonización al ingreso de la UCI cuando el primer frotis rectal realizado al ingreso en la UCI era positivo para *P. aeruginosa*. Se consideró colonización adquirida en la UCI cuando el aislamiento rectal con *P. aeruginosa* aparecía durante el ingreso en la UCI o al alta de la misma. Se definió como nueva colonización adquirida en la UCI a aquella en la que el fenotipo y genotipo de *P. aeruginosa* en un aislamiento rectal difería de los aislamientos previos del paciente.

1.3.4. Infección por *P. aeruginosa*.

La infección por *P. aeruginosa* se definió como la presencia de síntomas y signos compatibles de acuerdo con los criterios definidos por la CDC para el diagnóstico de infección nosocomial [148] junto con el aislamiento monomicrobiano en una muestra clínica.

) **Bacteriemia:** El foco de la bacteriemia se definió por criterios clínicos y microbiológicos, este último determinado por el aislamiento en una localización clínicamente significativa de la cepa de causante de la bacteriemia. La bacteriemia se consideró primaria o de foco desconocido en aquellos pacientes en los que no se identificó el origen de la misma. Se establecieron dos grupos en función del origen de la bacteriemia: el de bajo riesgo que incluía el foco urinario, pancreatobiliar y el de catéter vascular; y el alto riesgo que incluía el resto de los focos [96].

) **Neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV):** Se consideró que un paciente presentaba NAV cuando ésta comenzaba al menos 48 horas después de la intubación y cumplía criterios tanto microbiológicos (presencia de $>10^5$ UFC/ml colonias de *P. aeruginosa* en una muestra bronquial) como clínicos basados en la presencia de fiebre, leucocitosis o leucopenia, distrés respiratorio, secreciones respiratorias purulentas e infiltrado pulmonar en radiografía. La **traqueobronquitis asociada a la ventilación mecánica (TAV)** se definió como un cuadro clínico semejante a la NAV pero sin infiltrado pulmonar radiográfico compatible. Para la diferenciación de ambas entidades se utilizó el Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS) [149-150], considerándose NAV si la puntuación obtenida era igual o superior a seis puntos.

La presentación y repercusión clínica de la infección se definió en función de la presencia de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis grave, shock séptico y/o síndrome de fallo multiorgánico, definidas según los criterios estándar [113, 151] (**Anexo II.a**). Además se estimó la gravedad de los paciente en el momento de la infección mediante el uso de las escalas SOFA y SAPSII [152-153]. En el caso de pacientes con bacteriemia, se estimó la severidad de ésta mediante el índice PITT [154], tal y como se muestra en el **Anexo II.a**.

1.3.5. Paciente: Situación basal y comorbilidad.

La comorbilidad se definió en función de la presencia de las siguientes enfermedades de base: diabetes, cardiopatías, neumopatías crónicas, enfermedad neurológica discapacitante, insuficiencia renal crónica, cirrosis y enfermedad neoplásica. Se consideró que un paciente era oncológico si la neoplasia se había diagnosticado en los último últimos cinco años o si estaba recibiendo tratamiento específico. Se consideró que un paciente era inmunodeprimido si había recibido en los tres meses previos al ingreso quimioterapia, radioterapia, corticoterapia u otro tratamiento inmunosupresor. Además, se utilizó como indicador de la comorbilidad el índice de comorbilidad de Charlson [155] y como indicador de la gravedad del paciente el índice SAPS II (Simplified Acute Physiologic Score) [153].

La hospitalización previa fue definida como la hospitalización en los últimos tres meses o un ingreso hospitalario de más de 48 horas previo al traslado a la unidad de UCI. Se consideró que un paciente tenía una cirugía previa si se había sometido a una intervención quirúrgica en los tres meses anteriores al ingreso. La antibioticoterapia previa se definió como la exposición a antimicrobianos durante más de 48 horas en los tres meses previos a la infección.

1.3.6. Tratamiento, evolución y pronóstico.

-) **Tratamiento:** el tratamiento antibiótico empírico se definió como el antibiótico administrado en las primeras 24 horas de la infección y antes de conocer el informe definitivo de sensibilidad de cada cepa. El tratamiento administrado de acuerdo con el resultado del antibiograma se consideró tratamiento antibiótico dirigido. La antibioticoterapia fue adecuada cuando al menos uno de los antibióticos administrados tenía actividad *in vitro* frente a la cepa aislada. En caso de neumonía, la monoterapia con aminoglucósidos o con colistina inhalada se consideró inadecuada [156].
-) **Respuesta clínica y microbiológica:** Se consideró curación clínica a la resolución completa de los síntomas y signos de infección al final del tratamiento; mejoría clínica cuando al final del tratamiento la resolución de los síntomas y signos era parcial y fracaso clínico si existía un empeoramiento o persistencia de la clínica de infección a pesar del tratamiento. Se definió la recurrencia de la infección como la presencia de un nuevo episodio de infección al menos 72 horas después de la resolución clínica del episodio anterior. Se consideró erradicación microbiológica a la ausencia de crecimiento del patógeno al final del tratamiento y durante el resto del ingreso. La persistencia microbiológica fue definida como el crecimiento persistente del aislamiento de *P. aeruginosa* responsable de la infección, independientemente de la evolución clínica y la recurrencia microbiológica como su reaparición después de alguna muestra negativa.
-) **Pronóstico:** En cuanto al pronóstico se consideró mortalidad global a aquella ocurrida en los 30 días siguientes a la infección y mortalidad precoz o atribuible a aquella que se producía en los primeros cinco días y una vez excluidas otras causas.

1.4. Estudios Microbiológicos

1.4.1. Identificación y estudio de sensibilidad antibiótica de *P. aeruginosa*

La identificación de las cepas de *P. aeruginosa* efectuó según métodos convencionales [157] que incluían el estudio de la morfología de la colonia, la reacción de oxidasa, y pruebas bioquímicas. Como método confirmatorio de identificación se utilizó la espirometría de masas (MALDI-TOF) (Biotyper[®] Bruker) [158].

La estudio de sensibilidad antibiótica se realizó mediante el sistema de sistema de microdilución automatizado MicroScan Walkaway utilizando los paneles NC53 y NUC52 (Dade International, West Sacramento, CA, USA). De forma adicional, se utilizó el método de disco-difusión en agar y el método de E-test. Los antibióticos estudiados fueron: fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), penicilinas antipseudomónicas (piperacilina, piperacilina-tazobactan, ticarcilina), cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima, cefepime), monobactámicos (aztreonam), carbapenémicos (imipenem, meropenem), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina), polimixinas (colistina) y fosfomicina. Se utilizaron los criterios de sensibilidad definidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [159].

1.4.2. Conservación de las cepas

Las cepas de *P. aeruginosa* aisladas se conservaron mediante congelación a -80°C utilizando los criotubos de Glicerol y a temperatura ambiente utilizando tubos con medio CTA (Cystine Typtic Agar). En ambos casos, las cepas bacterianas a conservar, se obtuvieron a partir de cultivos frescos realizados en placas de agar sangre incubados durante 24h a 37°C.

1.4.3. Estudio genotípico y análisis de clonalidad.

-) **Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE , *pulsed-field gel electrophoresis*):** Este estudio de tipificación molecular se realizó en las cepas de las muestras clínicas y en muestras de portadores. Para ello, el ADN se preparó según los métodos estándar [160-161], y posteriormente se separó en grandes fragmentos mediante la digestión con el enzima de restricción *SpeI*. Los fragmentos del ADN se separaron por PFGE realizada con el aparato CHEF DR III (Laboratorios Bio-Rad, Madrid, España) de PFGE, a 6V/cm y a 14°C durante 23 horas, con pulsos cada 5 a 25-30 segundos. Los perfiles de restricción generados interpretaron según los criterios de Tenover *et al.* [162].

Figura 10. Electroforesis en campo pulsado de los aislamientos de *P. aeruginosa*.

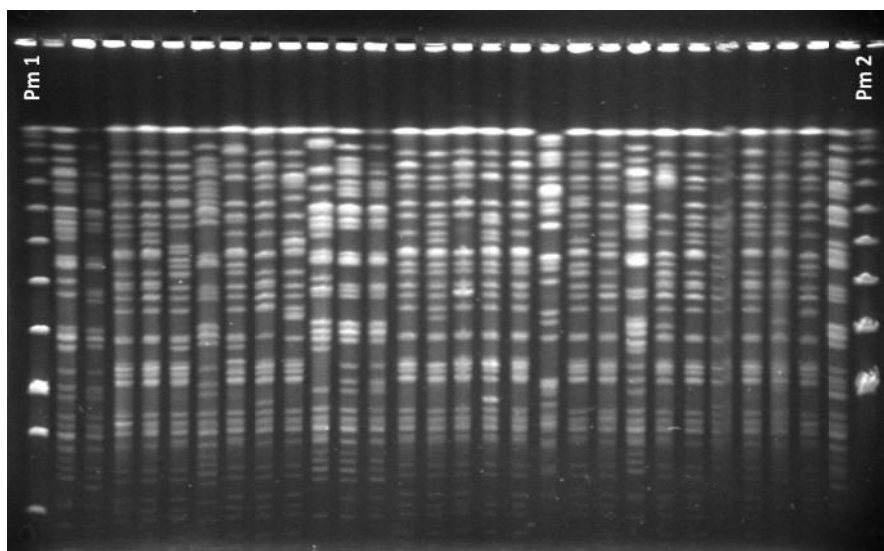


Figura 10. Patrones de bandas de ADN cromosómico (pulsotipos) de aislamientos de *P. aeruginosa*, obtenidos mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) tras restricción con *SpeI*. (Pm1, control de peso molecular lambda ladder PFG marker; Pm2, control de peso molecular low range PFG marker, New England BioLabs)

-) **Multilocus Sequence Typing (MLST):** El análisis de la relación clonal a través de la secuenciación de 7 genes “housekeeping” y asignación de “Sequence Types” se realizó en una selección de cepas representativas de cada tipo de perfil de PFGE obtenido. El MLST se realizó según los protocolos [163] y las bases de datos disponibles (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) [164].

1.5. Estudios Inmunológicos.

Se estudiaron citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias [interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-10 (IL-10)] y otros biomarcadores inflamatorios como la procalcitonina (PCT) y la proteína C reactiva (PCR). La muestra sanguínea de los pacientes era depositada en tubos con EDTA que se centrifugaban inmediatamente después de la extracción sanguínea. Posteriormente, el suero obtenido se repartía en diferentes alícuotas que eran congeladas a -80°C para su correcta conservación.

La determinación de citoquinas se realizó con citometría de flujo mediante la técnica de Cytometric Bead Arrays (CBA). Los valores límites de detección fueron 5 pg/mL para la IL-6 y 1pg/L para la IL-10. La determinación de la procalcitonina se realizó mediante técnicas de inmunoensayo de electroquimioluminiscencia, siendo el valor límite de detección 0.02ng/mL. La PCR fue cuantificada mediante la utilización del ensayo inmunturbidimétrico, con un límite de detección de 1mg/L.

1.6. Métodos estadísticos

Los datos fueron introducidos en una base de datos informatizada de Microsoft Access para su posterior explotación. Los análisis estadísticos fueron realizados en su mayoría con el paquete estadístico SPSS versión 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPPS Inc. Chicago, IL, USA). Para algunos análisis de mayor complejidad se utilizó el software R versión 3.1.2.

En todos los trabajos se utilizó inicialmente el test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad del conjunto de datos. Si la distribución de la muestra era normal, las variables continuas fueron expresadas como media \pm desviación estándar (SD) y comparadas con la prueba de t de Student o ANOVA. En caso contrario, las variables continuas se expresaron como mediana y rango intercuartil (IQR) y se utilizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis). En cuanto a las variables categóricas se expresaron como números absolutos y porcentajes y se compararon mediante la χ^2 o Fisher según fuese apropiado. En los trabajos retrospectivos se utilizó análisis de regresión logística, mientras que en los estudios prospectivos, al disponerse de las variables en función del tiempo, se realizó el análisis crudo mediante el método de Kaplan-Meier y el análisis ajustado mediante regresión de Cox.

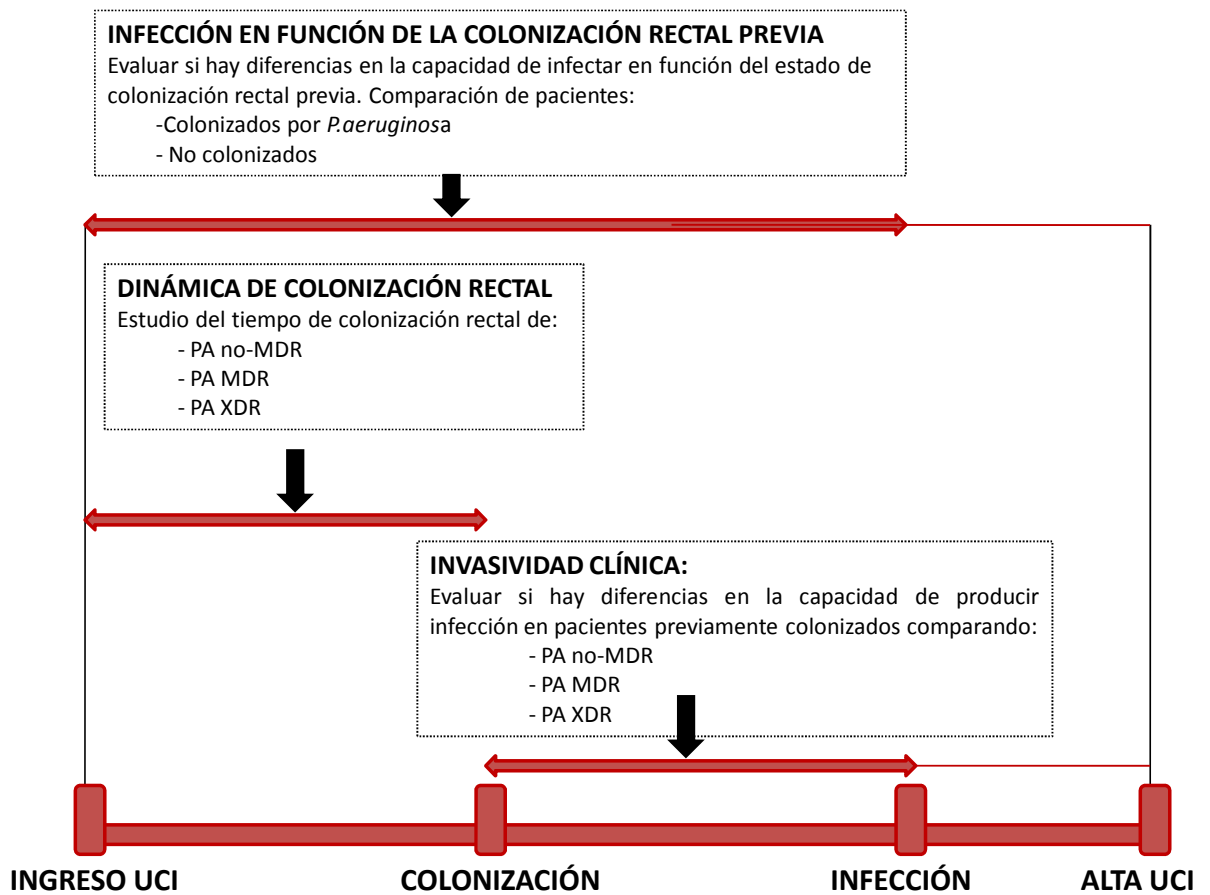
Dada su mayor complejidad se explicarán con más detalles los métodos estadísticos utilizados en los estudios epidemiológicos de colonización e infección por *P. aeruginosa*:

1.6.1. Estudio de la dinámica de colonización intestinal por *P. aeruginosa* (artículo 1)

Para estudiar la dinámica de colonización rectal por *P. aeruginosa* se incluyeron únicamente aquellos pacientes sin colonización rectal por *P. aeruginosa* al ingreso en la UCI. Se evaluó la velocidad a la que los pacientes se colonizaban en función del fenotipo de resistencia (no-MDR, MDR no-XDR y XDR) mediante un análisis de Kaplan-Meier. El tiempo fue medido desde

el día de ingreso en UCI (tiempo 0) hasta la fecha de colonización rectal por cada cepa de *P. aeruginosa* (evento principal), como se muestra en la **figura 11**. Si un paciente estaba colonizado por diferentes cepas de se consideró un episodio por cada patrón de resistencia.

Figura 11. Colonización e infección por *P. aeruginosa* en pacientes de UCI.

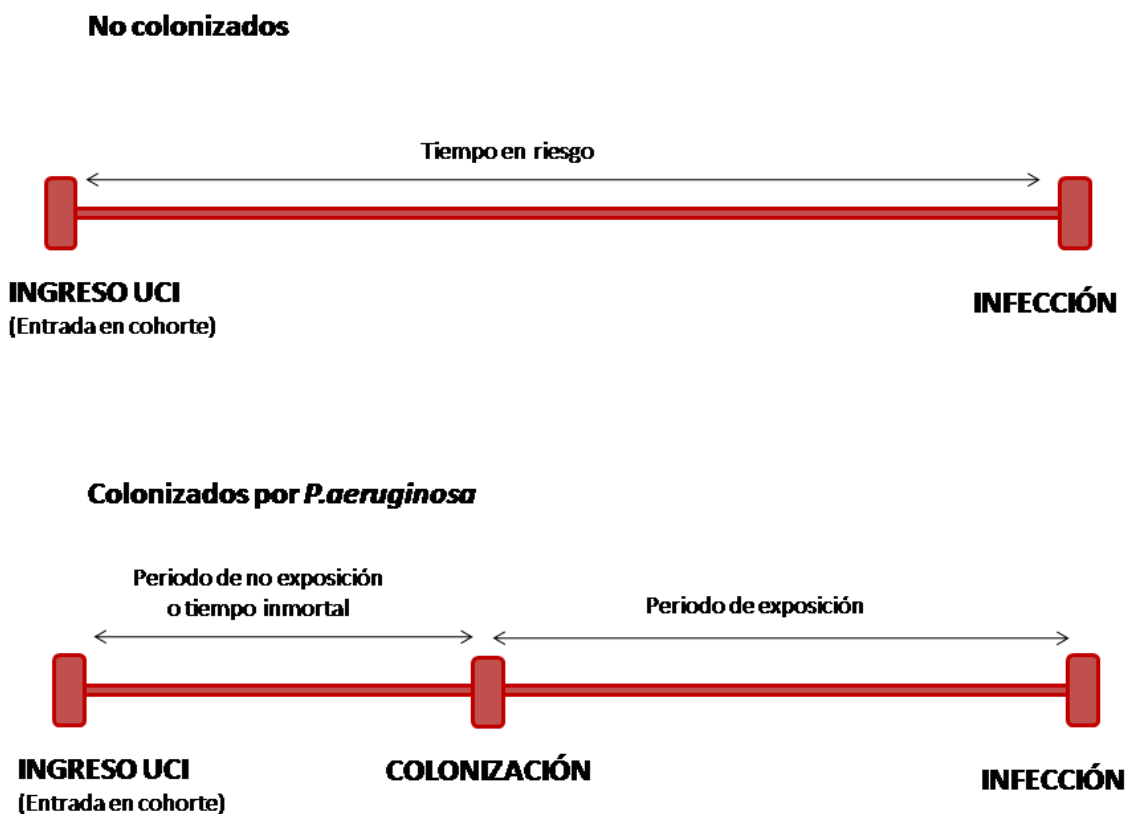


1.6.2. Estudio de la capacidad de desarrollar infección en función de la existencia de colonización rectal previa por *P. aeruginosa* (artículo 2).

Para estudiar el papel de la colonización rectal como predictor de una infección posterior por *P. aeruginosa* se utilizó el método de Kaplan Meier y se comparó los pacientes colonizados rectalmente por *P. aeruginosa* con aquellos no colonizados. Se consideró tiempo 0 el día del ingreso en la UCI y el evento principal el presentar un episodio de infección por *P. aeruginosa*

como muestra la **figura 11**. En el diseño de este estudio nos planteamos la posibilidad del llamado "*sesgo de tiempo inmortal*". El tiempo inmortal o tiempo de no exposición se refiere a un período durante el cual el evento (en nuestro caso la infección) no puede ocurrir y, sin embargo, el tiempo transcurrido se computa como tiempo de supervivencia [165-166]. En nuestro estudio, el tiempo entre la entrada en la cohorte (ingreso en UCI) y el primer frotis rectal positivo podía representar un tiempo inmortal si se considera que el riesgo de desarrollar infección es diferente antes y después de la colonización. Esto induciría a cometer un "sesgo de tiempo inmortal" al imputar ese tiempo de no exposición como tiempo de exposición en el grupo de colonizados, como se muestra en la **figura 12**. Para evitar la posibilidad de dicho sesgo, se analizó la variable "frotis rectal positivo", creada usando la fecha del primer frotis rectal positivo para *P. aeruginosa*, como co-variable dependiente del tiempo [165].

Figura 12. Infección y colonización por *P. aeruginosa*: "sesgo de tiempo inmortal".



1.6.3. Estudio de la capacidad de desarrollar infección por *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia de *P. aeruginosa* (artículo 2).

La invasividad clínica en función del patrón de resistencia se analizó mediante la comparación de la capacidad de desarrollar infección en pacientes previamente colonizados por *P. aeruginosa* no-MDR, MDR no-XDR y XDR, como se muestra en la **figura 11**. Se consideró tiempo 0 al día de colonización por *P. aeruginosa* (fecha del primer frotis rectal positivo). El evento principal fue presentar una infección por la misma cepa que había sido aislada en el frotis rectal. La duración de la colonización fue calculada como el tiempo desde la colonización hasta: 1) la fecha de un episodio de infección por la misma cepa de *P. aeruginosa* aislada en el frotis rectal; 2) la fecha de cambio de perfil de resistencia de la *P. aeruginosa* aislada en el frotis rectal; o 3) la fecha de alta de la UCI en pacientes que no desarrollaron infección. Los pacientes que estaban colonizados por ≥ 2 cepas diferentes de *P. aeruginosa* fueron considerados como ≥ 2 episodios. Sin embargo, si la colonización rectal ocurría con posterioridad al desarrollo de la infección o si no se objetivaba colonización rectal durante el ingreso, dicho episodio no era incluido.

1.6.4. Impacto de antibioticoterapia en la colonización e infección por *P. aeruginosa*.

Para estudiar el impacto de la antibioticoterapia previa en la colonización rectal por *P. aeruginosa* la duración de exposición a antibióticos fue recogida desde los tres meses previos al ingreso en la UCI hasta el primer día con un frotis rectal positivo para *P. aeruginosa* en los pacientes colonizados y hasta el día del alta o del fallecimiento en pacientes no colonizados.

Para analizar el impacto de la exposición previa a antibióticos en el desarrollo de infección clínica por *P. aeruginosa*, la antibioticoterapia fue recogida desde tres meses previos al ingreso en la UCI hasta el día de la infección en pacientes infectados y hasta el día del alta o fallecimiento en los pacientes sin infección por *P. aeruginosa*.

1.7. Aspectos éticos

En todos los estudios, la recogida de datos de los pacientes se realizó teniendo en cuenta el principio de confidencialidad y privacidad del paciente. Dado el carácter observacional y retrospectivo de los primeros dos estudio no requirieron la solicitud de consentimiento informado.

Los estudios derivados de la cohorte observacional prospectiva de pacientes fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari de Bellvitge (**Anexo III**). Se solicitó un consentimiento informado escrito a todos los participantes, tras informar sobre la realización del estudio y la posibilidad de participar en él. En los casos en los que los pacientes no podían firmar directamente el consentimiento (frecuente al ser el ámbito del estudio la UCI y tratarse de pacientes en estado crítico) la firma se obtenía de un familiar directo o representante legal del paciente.

2. Investigación Experimental

2.1. Ámbito de estudio

Los estudios experimentales se realizaron en el Laboratorio de Infección Experimental del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, en el Campus de Bellvitge, vinculado al Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital de Bellvitge.

Los estudios de experimentación animal se realizaron en el estabulario de la Universidad de Barcelona-Bellvitge, en dicho Campus. El estabulario cuenta con personal entrenado en el cuidado de animales y con un veterinario. Se dispuso de una sala exclusiva para nuestro experimento en la que se estabularon los ratones infectados por *P. aeruginosa*, se realizaron las cirugías y la recogida de las muestras, que eran posteriormente procesadas y estudiadas en el laboratorio de infección experimental. La doctoranda fue la responsable de realizar en su totalidad el modelo experimental animal, de analizar y procesar las muestras derivadas de éste. Para ello, se formó previamente con la realización del "Curso de Formación de Personal Investigador Usuario de Animales de Experimentación" de la Universidad de Barcelona (**Anexo III**) y mediante la realización de una estancia formativa en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) para familiarizarse con el modelo de experimentación de peritonitis murina. Contó con el apoyo y supervisión del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge para la preparación del inóculo bacteriano.

En cuanto a los estudios *in vitro*, la doctoranda realizó los estudios de tasa de crecimiento bacteriano. El resto de los estudios *in vitro*, fueron realizados con la colaboración del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Son Espases y el Instituto de Investigación Sanitaria de Palma de Mallorca (IdiSPa).

2.2. Diseño Experimental

2.2.1. Cepas de estudio

Tanto en los estudios *in vitro* como en los estudios *in vivo*, se utilizaron nueve cepas de *P. aeruginosa* con diferente fenotipo, genotipo y diferente patrón de resistencia, cuyas características se muestran en la **tabla 4** . Se seleccionaron dos cepas de laboratorio como cepas de referencia: la PAO1 (referencia de invasividad) y la PA14 (referencia de citotoxicidad). Las otras siete fueron cepas clínicas aisladas en pacientes incluidos en el estudio clínico prospectivo previamente descrito, que habían presentado una infección invasiva por *P. aeruginosa* durante el periodo de estudio. Los aislamientos clínicos utilizados correspondían a las muestras con las que se había realizado el diagnóstico de infección en dichos pacientes.

Las dos cepas de referencia (cepa 1 y 2) fueron sensibles a todos los antibióticos antipseudomónicos testados, al igual que las cepas clínicas HUB 282853/12 (cepa 3), HUB 302353/12 (cepa 4) y HUB 205003/13 (cepa 5). Las otras cuatro cepas clínicas mostraban un patrón de multirresistencia o de extrema resistencia. La cepa HUB 246520/12 (cepa 6) se seleccionó como representante de una cepa MDR no-XDR no clonal . Las tres cepas restantes pertenecían a los tres clones epidémicos de alto riesgo más comunes a nivel mundial: ST-111 (cepa HUB 259463/12 o cepa 7) , ST-235 (cepa HUB 293881/13 o cepa 8) ST-175 (cepa HUB 273708/12 identificada como cepa 9). Todas las cepas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) [160-162] y mediante tipificación multilocus de secuencia (multilocus sequence typing, MLST) según los protocolos [163] y las bases de datos disponibles (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) [164]. La sensibilidad antibiótica se analizó mediante el sistema de microdilución automatizado MicroScan Walkaway (Dade International, West Sacramento, CA, USA) siguiendo los criterios de sensibilidad definidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [159].

Isolate	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
Remarks	Reference (PAO1)	Reference (PA14)	Clinical strain (HUB282853/12)	Clinical strain (HUB302353/12)	Clinical strain (HUB205003/13)	Clinical strain (HUB246520/12)	Clinical strain (HUB259463/12)	Clinical strain (HUB293881/13)	Clinical strain (HUB273708/12)
Clinical sample	NA	NA	Blood	Respiratory	Respiratory	Respiratory	Respiratory	Peritoneal fluid	Blood
MLST	ST-549	ST-253	ST-17	ST-381	ST-1707	ST-274	ST-111	ST-235	ST-175
PFGE	Reference	Reference	Non-epidemic	Non-epidemic	Non-epidemic	Non-epidemic	Epidemic clone	Epidemic clone	Epidemic clone
Resistant profile	MultiS	MultiS	MultiS	MultiS	MultiS	MDR non-XDR	MDR non-XDR	XDR	XDR
Resistant mechanisms	NA	NA	NA	NA	NA	AmpC Hyperproduction AG modifying enzyme	MexXY-OprM overexpression PSE-1 lactamase AG modifying enzyme QRDR mutations	VIM-2 MBL AG modifying enzyme QRDR mutations	OprD porin deletion AmpC Hyperproduction AG modifying enzyme QRDR mutations
Resistant phenotype									
Carbapenems									
MEM	S	S	S	S	S	S	S	R	R
IPM	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Aminoglycosides									
GEN	S	S	S	S	S	R	R	R	R
TOB	S	S	S	S	S	S	R	R	R
AMK	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Antipseudomonal cephalosporins									
FEP	S	S	S	S	S	I	I	R	R
CAZ	S	S	S	S	S	R	S	R	R
Antipseudomonal penicillins									
TZP	S	S	S	S	S	R	R	R	R
TIC	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Fluoroquinolones									
CIP	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Monobactams									
ATM	S	S	S	S	S	R	S	R	R
Phosphonic Acid									
FOF	S	S	S	S	S	R	S	R	R
Polymixins									
CST	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Table 4. Molecular features, susceptibility profiles and resistant mechanisms of the *P. aeruginosa* isolates studied.

NA, not applicable; multiS, multidrug susceptible; MDR, multidrug resistant; XDR, extensively drug resistance; AG, aminoglycoside; MBL, metallo- β -lactamase; MEM, meropenem; IPM, imipenem; GEN, gentamicin, TOB, tobramycin, AMK, amikacin, FEP, cefepime, CAZ, ceftazidime, TZP, Piperacillin-tazobactam; TIC, ticardillin; CIP, ciprofloxacin; ATM, aztreonam; FOF, fosfomicin; CST, colistin.

2.2.2. Estudios *in vitro*

Determinación de la tasa de crecimiento bacteriano *in vitro*.

Tras el cultivo de las bacterias en placas de agar sangre al 5% a 37°C, las cepas eran sembradas en caldo TSB e incubadas con agitación continua a 37°C durante 12 horas. Posteriormente, se ajustaba el inóculo mediante turbidez hasta una concentración aproximada de 10⁸ UFC/ml y se hacían diluciones 1:10 hasta conseguir concentraciones de 10⁵ UFC/ml. El inóculo obtenido era entonces incubado en una estufa con agitación continua a 37°C durante 24 horas, obteniéndose muestras seriadas horarias durante las primeras 8 h y a las 24h para calcular el recuento bacteriano en cada punto horario. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Para analizar los perfiles de crecimiento *in vitro*, la constante de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación bacteriana (g) fueron estimados de la forma siguiente:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t - t_0}$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde μ es la constante de crecimiento, g el tiempo de generación o duplicación (en horas), N y N_0 el recuento de colonias (UFC/ml) a tiempo t y t_0 (dos puntos dentro de la curva exponencial de crecimiento).

El resto de los estudios *in vitro* fueron realizados con la colaboración del Servicio de Microbiología del Hospital de Son Espases (Palma de Mallorca) y están ampliamente detalladas en la sección de métodos de los artículos correspondientes.

2.2.3 Estudios *in vivo*: Modelo de peritonitis-sepsis en ratón.

Se utilizaron ratones hembra inmunocompetentes C57BL/6 (18-21 gr) proporcionados por el Laboratorio Harlam. Se estabularon cinco ratones por jaula, que dispusieron en todo momento de agua y comida *ad libitum*. Se mantuvieron condiciones controladas de temperatura y humedad ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$ con $50\pm 10\%$ de humedad relativa) y un ciclo de luz/oscuridad estándar de 12/12 horas.

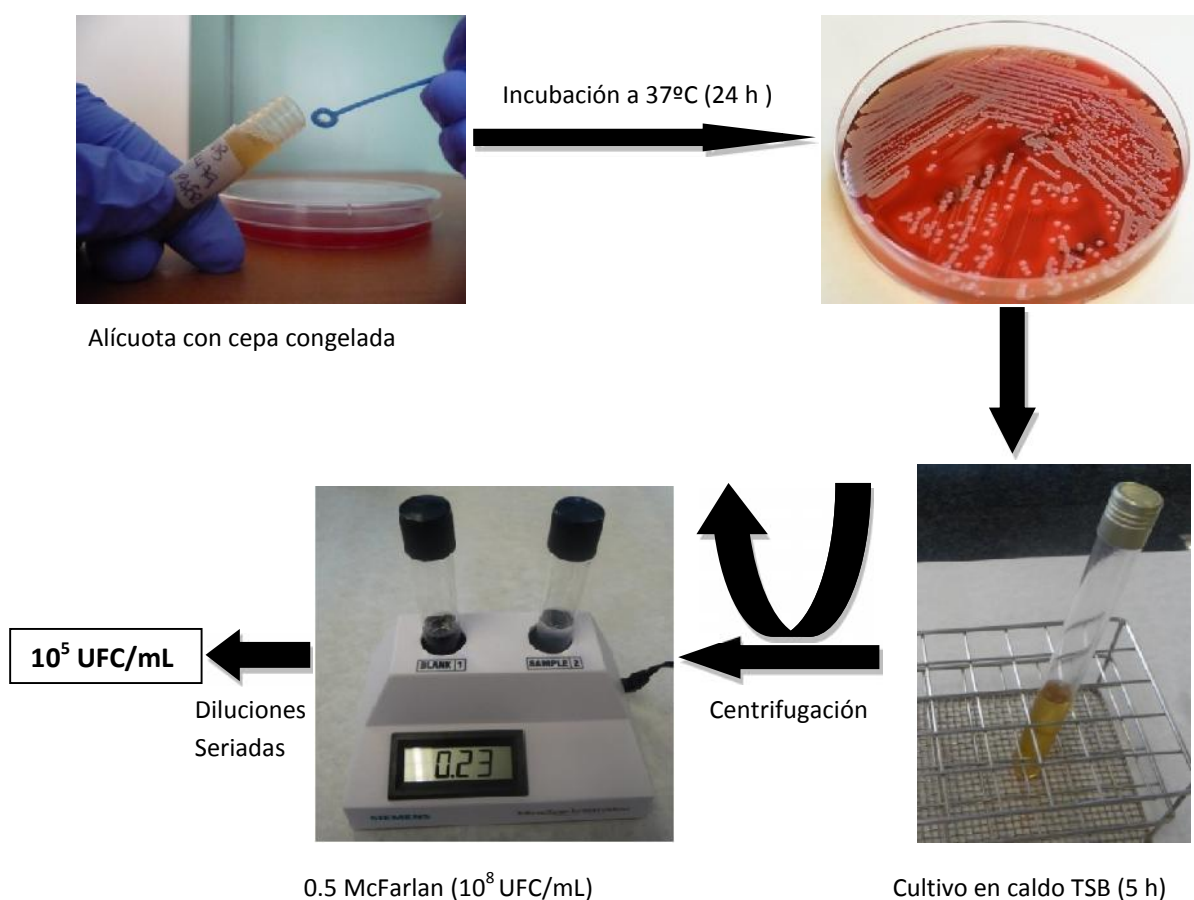
2.2.3.1. Preparación del inóculo.

Dos días antes de la inoculación, partiendo de las alícuotas con las cepas de *P. aeruginosa* congeladas, se realizaba un pase a placas de agar sangre que se incubaban a 37°C durante 24 horas para el cultivo bacteriano. Al día siguiente, se resuspendían algunas colonias en caldo TSB y se dejaban crecer durante 5 horas en una estufa de 37°C en agitación continua. Pasadas las 5 horas de incubación e inmediatamente antes de la inoculación de los ratones, se centrifugaba la muestra crecida en caldo TSB y el sedimento bacteriano obtenido de la centrifugación se suspendía con suero fisiológico estéril hasta ajustarse por turbidez a una densidad de 0.5 McFarland (equivalente a una concentración bacteriana de 10^8 UFC/ml) y posteriormente se hacían diluciones 1:10 hasta obtener el inóculo deseado de 10^5 UFC/ml, tal y como se muestra en la **figura 13**.

Como adjuvante se utilizó mucina gástrica porcina (M2378, Sigma Chemical Company) preparada con suero fisiológico al 10 %. El inóculo final utilizado para la infección consistió en la dilución 1:1 de la suspensión bacteriana con una concentración de aproximadamente 10^5 UFC/ml y la mucina, dando una concentración final de 5%. La mucina inhibe temporalmente la acción de los macrófagos locales del peritoneo, de forma que permite que se establezca la infección bacteriana [139]. La decisión de utilizar mucina vino determinada por los resultados

obtenidos en la fase de estandarización del modelo experimental. En ella, se objetivó que sin ella la infección no se establecía y la mortalidad era nula en todas las cepas, excepto si se utilizaban concentraciones bacterianas muy elevadas (10^8 UFC/ml) con los que la mortalidad era muy precoz en todas las cepas lo que impedía la realización de estudios de supervivencia.

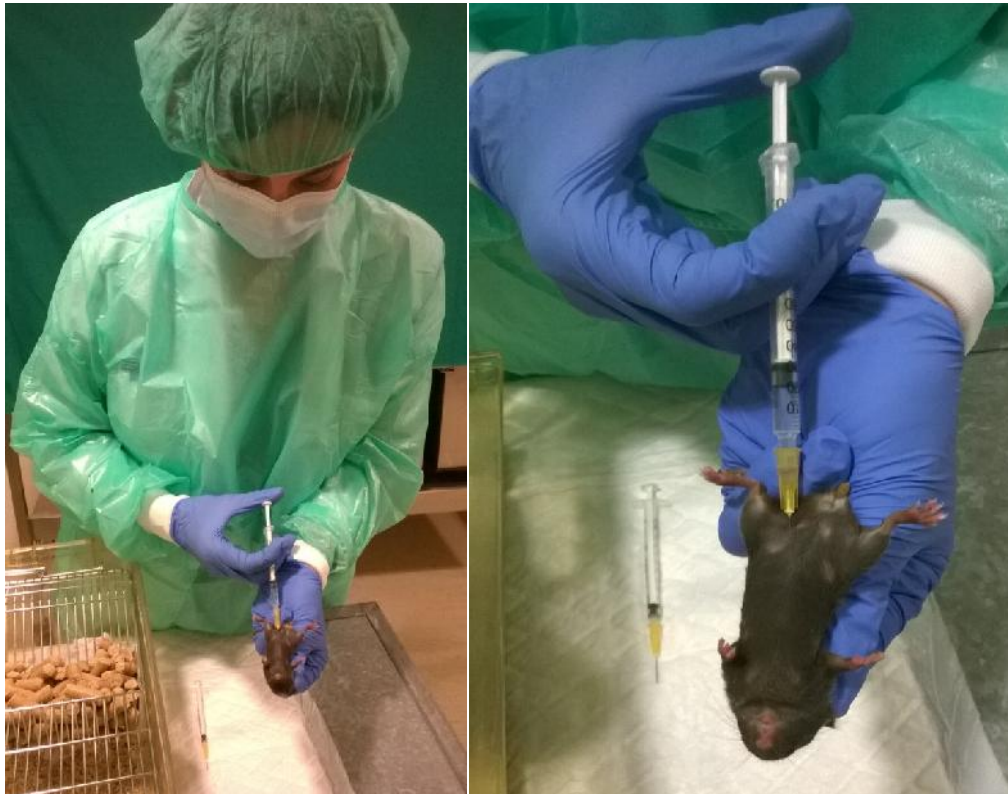
Figura 13. Preparación inóculo bacteriano para modelo experimental animal.



2.2.3.2. Inoculación de la muestra.

Los animales fueron inoculados mediante una inyección intraperitoneal de 0,5ml de inóculo bacteriano preparado de acuerdo con lo expuesto anteriormente y posteriormente eran devueltos a su jaula. En las fotografías de la **figura 14** se muestra cómo se procedía a la inyección del inóculo bacteriano.

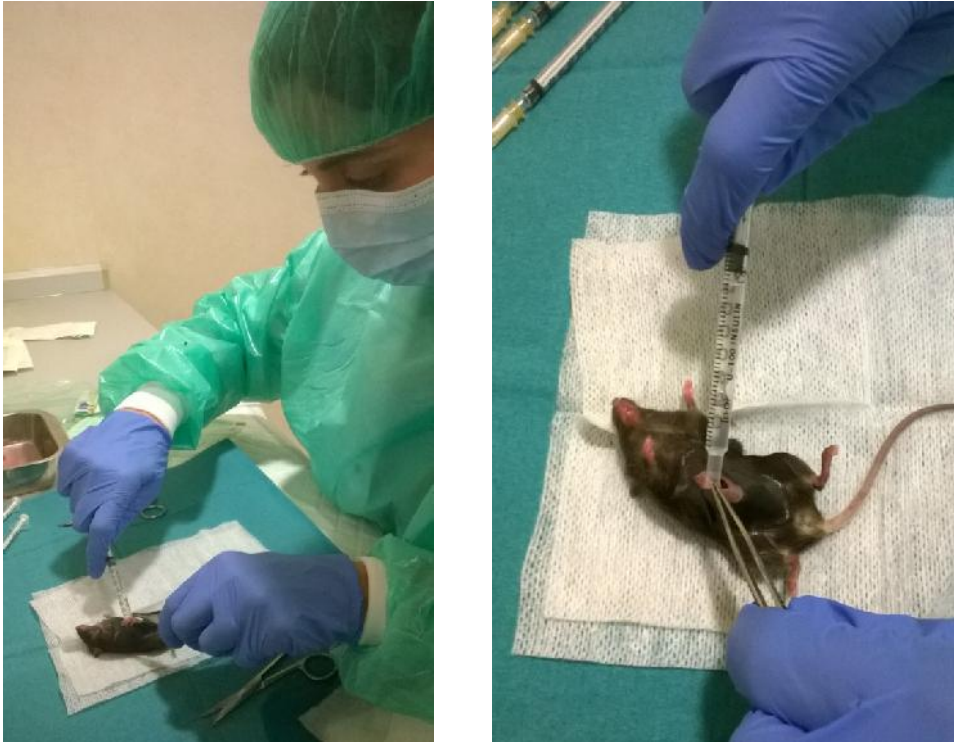
Figura 14. Inoculación de *P. aeruginosa* mediante inyección intraperitoneal.



2.2.3.3. Obtención de las muestras.

La obtención de las muestras se realizaba tras la anestesia total del animal con ketamina/xylacina. Para la obtención del líquido peritoneal se realizaba un lavado peritoneal inyectando 2 ml de SF estéril, seguido de un masaje externo abdominal de un minuto para homogeneizar el contenido peritoneal. Tras desinfectar la piel de la zona, se abría el abdomen mediante una incisión de 1-1,5 cm con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras estériles, utilizando un equipo diferente para cada ratón. Posteriormente, se introducía una jeringa en la cavidad peritoneal abierta y se extraía 1ml de líquido peritoneal, tal y como se muestra en las fotografías de la **figura 15**.

Figura 15. Obtención de la muestra de líquido peritoneal.



A continuación, se realizaba extracción de sangre (400-800 μ l) por punción intracardiaca (**figura 16**) y en ese momento se sacrificaba al animal por dislocación cervical.

Figura 16. Obtención de muestra sanguínea mediante punción intracardiaca.



2.2.3.4. Procesamiento de las muestras biológicas.

Las muestras de líquido peritoneal se utilizaron para:

-) **Recuento bacteriano en líquido peritoneal:** Recuento de colonias bacterianas realizando cultivo directo y de las diluciones seriadas 1:10 en SF en placas de agar sangre que se incubaron a 37º durante 24h previamente a su lectura.

Figura 17. Recuentos bacterianos tras diluciones seriadas.



Figura 17. La realización de cultivo directo y diluciones seriadas 1:10 permitía realizar un recuento bacteriano de las muestras de líquido peritoneal.

-) **Recuento leucocitario en líquido peritoneal:** La muestra se diluyó con solución de Turk (1:2) para lisar los hematíes y favorecer la visualización de los leucocitos. Posteriormente se procedía al recuento leucocitario al microscopio óptico con una cámara de Neubauer.

Figura 18. Visualización de leucocitos al microscopio mediante cámara de Neubauer.

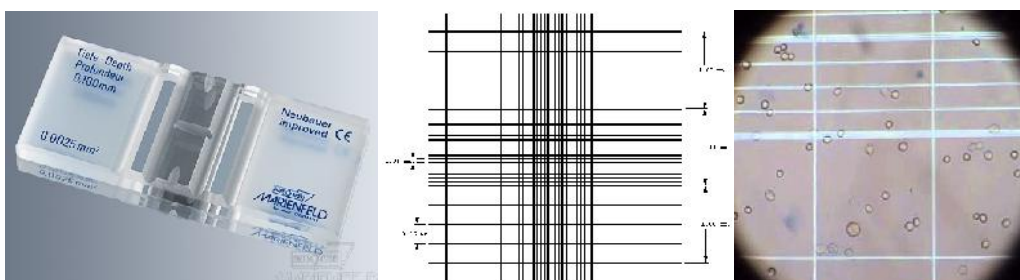


Figura 18. Tras dilución con solución de Turk, la muestra se introducía por capilaridad en la cámara de Neubauer. Esta cámara está marcada con cuadrículas de dimensiones conocidas que favorecen el recuento celular y que permiten calcular en función del volumen de líquido introducido la concentración de leucocitos de la muestra. Las muestras se visualizaban con microscopio óptico.

Las **muestras de sangre** obtenidas por punción intracardíaca fueron utilizadas para:

-) **Estudio de la bacteriemia:** Se analizó la existencia de bacteriemia de forma cualitativa mediante el cultivo de la muestra de sangre en caldo TSB durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se hacía un pase de 0.1ml del caldo a una placa de agar sangre que se incubaba durante 24h a 37°C previamente a su lectura.

Figura 19. Análisis cualitativo de la presencia de bacteriemia.

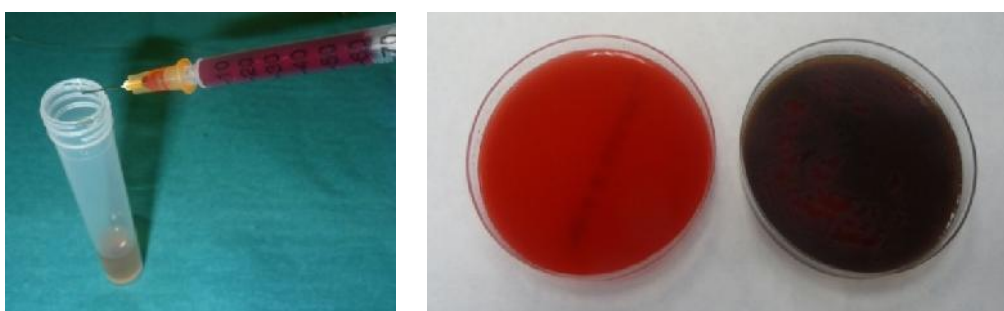
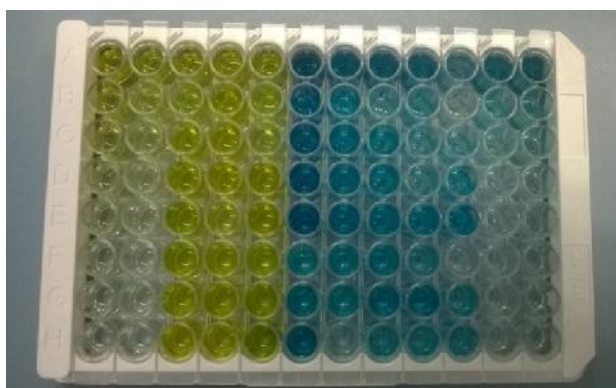


Figura 19. Imagen izquierda, introducción de una muestra de sangre en caldo TSB que posteriormente se incubaba durante 24h a 37°C. **Imagen derecha**, Siembra de la muestra cultivada en TSB en placa de agar sangre y lectura a las 24h. Placa de la izquierda sin crecimiento bacteriano (no bacteriemia), placa de la derecha con crecimiento y ,por lo tanto, bacteriemia.

-) **Estudio de respuesta inflamatoria:** La determinación de las interleuquinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) fue realizada mediante técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) siguiendo el protocolo de los kits comerciales de ELISA específicos para ratón de eBioscience, an Affymetrix Company (Campus Vienna Biocenter 2, Austria). Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Figura 20. Placa de ELISA utilizada para cuantificar las interleuquinas séricas del ratón.



2.2.3.5. Estudios de mortalidad.

Se establecieron grupos de 10 animales y cada grupo fue inoculado por una cepa de *P. aeruginosa* diferente. Tras la inoculación intraperitoneal, los ratones eran devueltos a sus jaulas y se supervisaba la evolución durante siete días. Las primeras 24h fueron supervisados a las 4h, 8h, 12h y 24h; posteriormente cada 12h.

2.2.3.6. Estudios de monitorización de la respuesta inflamatoria de la infección

Se establecieron grupos de cinco animales por cepa y por punto horario (4h, 8h y 12h tras la inoculación bacteriana). En cada punto horario, tras anestésiar al animal se obtenían muestras de líquido peritoneal (para determinar el recuento bacteriano y leucocitario) y de sangre (para determinar la presencia de bacteriemia y medir las interleuquinas séricas). Adicionalmente, se estudió un grupo control de 10 animales sin infección.

2.3. Análisis estadístico

Mediante la prueba de Shapiro-Wilks se realizó un estudio de la normalidad de la muestra y en función de los resultados las variables continuas fueron expresadas como media \pm desviación estandar o mediana y rango intercuartil. Las comparaciones fueron realizadas mediante t Student o ANOVA si la distribución era normal o con pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis) si no lo era. En cuanto a las variables categóricas se expresaron como números absolutos y porcentajes y se compararon con mediante la X^2 o Fisher según correspondiera. Los estudios de supervivencia fueron realizados mediante análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Todos los estudios estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, USA), versión 19.0.

2.4. Aspectos éticos

Este estudio cumple la legislación y guías internacionales vigentes de protección de animales usados con fines científicos. Todos los experimentos se han realizado según la Directiva Europea (2010/63/EU) y la legislación española (RD53/2013) del uso de animales en experimentación y otros fines científicos. El estudio fue aprobado por Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Barcelona (**Anexo III**) y cuenta con la autorización expresa del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (DAAM) de la Generalitat de Catalunya con el número de orden de DAAM 7312 (**Anexo III**).

3. Plan de trabajo.

A continuación se enumeran las funciones realizadas por la doctoranda y los investigadores que han colaborado en la presente tesis doctoral.

3.1. Estudios clínicos.

3.1.1. Estudios Retrospectivos.

- Diseño de base de datos y protocolos para la recogida de datos.
- Revisión de historias clínicas e inclusión de episodios de neumonías y bacteriemias.
- Colaboración en el análisis estadístico de los datos y en la confección de los manuscritos.

3.1.2. Estudio prospectivo observacional.

La doctoranda fue la licenciada a cargo del proyecto (FIS PI11/00164) y como tal se encargó de:

- Presentación al Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari de Bellvitge.
- Confección, actualización y depuración de la base de datos (Microsoft Access).
- Reclutamiento de los pacientes con criterios de inclusión en el estudio.
- Solicitud del consentimiento informado al paciente y/o familiares previo a la inclusión.
- Realización de la vigilancia activa de colonización por *P. aeruginosa*, encargándose de realizar frotis rectales semanales de los pacientes durante su estancia en UCI.
- Seguimiento prospectivo de los pacientes hasta el alta hospitalaria. Monitorización clínica diaria de los pacientes en coordinación con las **Dra. Rosario Cañizares y Dra. Elisabet Periche**, del Servicio de Medicina Intensiva, con las que se comentó a diario la situación de los pacientes para detectar de forma precoz las infecciones por *P. aeruginosa*.
- Recogida prospectiva de los datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes. Inclusión de estos datos en la base de datos informatizada.

- Procesamiento de las muestras de *P. aeruginosa* para su correcta congelación. La identificación de las cepas, los estudios de sensibilidad antibiótica y genotípicos fueron realizados por las **Dra. Fe Tubau, Dra. M^a Ángeles Domínguez y Dra. Mariana Camoez** del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge.
- Obtención, centrifugación y congelación de las muestras séricas para análisis de la respuesta inflamatoria. Posteriormente, el estudio inmunológico y bioquímico fue realizado por el **Dr. Francisco Morandeira** y la **Dra. M^a José Castro** de los Servicios de Inmunología y Bioquímica del Hospital Universitari de Bellvitge.
- Explotación y análisis estadístico de los datos clínicos y microbiológicos.
- Confección de los tres manuscritos derivados de los resultados para su difusión científica.

3.2. Estudios experimentales.

3.2.1. Estudios experimentales *in vitro*:

- Realización de los estudios de tasas de crecimiento bacteriano *in vitro* por la doctoranda.
- El resto de los estudios *in vitro* fueron realizados con la colaboración del **Dr. Antonio Oliver, Dr. Carlos Juan y Gabriel Cabot** del Servicio de Microbiología del Hospital de Son Espases (Palma de Mallorca). La doctoranda se encargó de congelar las muestras clínicas y epidemiológicas, coordinar su recuperación y el envío a dicho centro.

3.2.2. Estudios experimentales *in vivo*:

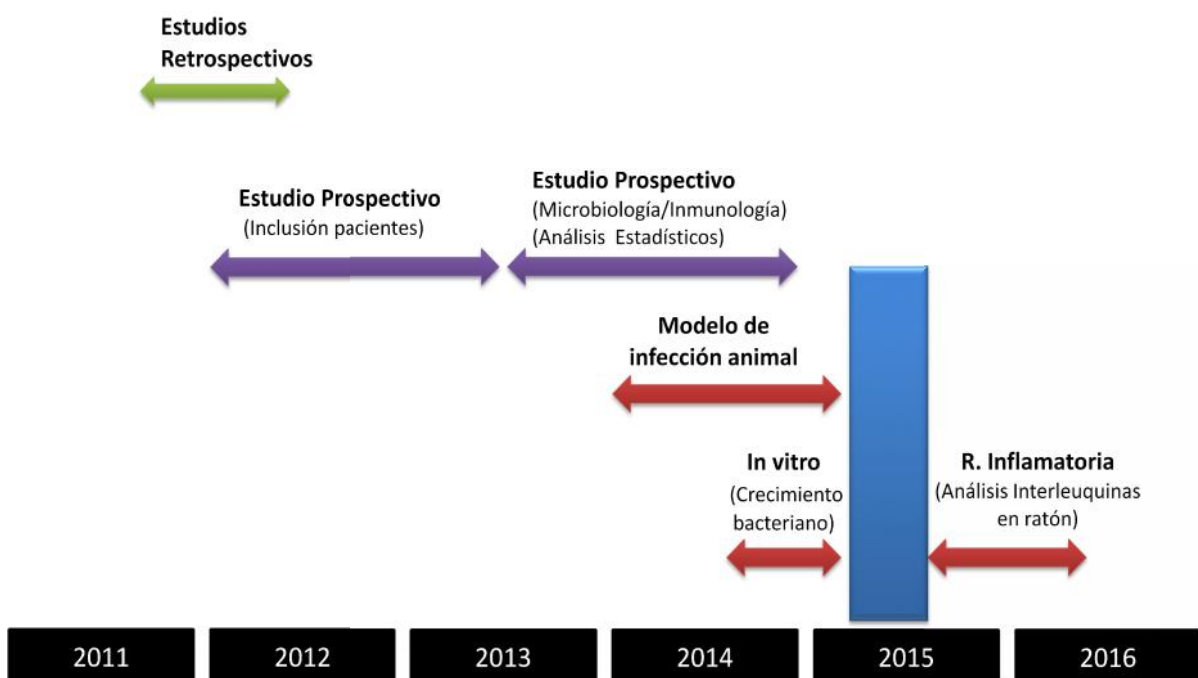
La doctoranda fue la investigadora principal del procedimiento animal y se encargó de:

- Confeccionar la memoria descriptiva del procedimiento necesaria para la aprobación de éste por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA).
- Presentación del estudio al CEEA de la Universidad de Barcelona para su aceptación.
- Ejecución del modelo experimental animal. La doctoranda contó con el asesoramiento de la **Dra. M^a Eugenia Pachón** del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBis).

- Procesamiento de las muestras derivadas del modelo animal para los estudios microbiológicos y de respuesta inflamatoria. La realización de los ELISA para determinación de las citoquinas en los ratones fue llevada a cabo por la doctoranda, bajo la supervisión de la **Dra. Laura Calatuyud** del Servicio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge.
- Creación de las bases de datos, explotación y análisis estadístico de los datos
- Confección de los dos manuscritos para la publicación de los resultados derivados de los estudios *in vitro* e *in vivo*, para su difusión en la comunidad científica.

Todos los trabajos clínicos y experimentales fueron realizados con la tutoría de la **Dra. Carmen Peña Miralles** y **Dr. Javier Ariza Cardenal**, directores de tesis de la doctoranda.

Figura 21. Cronología de la realización de los trabajos.



RESULTADOS

OBJETIVO 1. Describir la dinámica de colonización intestinal de *P. aeruginosa* en pacientes críticos en función del fenotipo de resistencia antibiótica.

Artículo 1. Antibiotic pressure is a major risk factor for rectal colonization by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients.

Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Periche E, Cañizares R, Dominguez MA, Ariza J, Peña C.

Antimicrob Agents Chemother. 2014 Oct; 58(10): 5863-5870

Durante un periodo de 18 meses se analizó de forma prospectiva la epidemiología de la colonización intestinal de *P. aeruginosa* en pacientes ingresados en UCI y se evaluó la dinámica de colonización intestinal por *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia de la cepa.

Se realizaron un total de 936 frotis rectales en 414 pacientes. 179 (43%) pacientes presentaron algún frotis rectal positivo para *P. aeruginosa* durante el ingreso [112 (63%) ya presentaban colonización al ingreso en la UCI y 67 (37%) que se colonizaron durante el ingreso en la unidad], mientras que 235 pacientes (57%) no se colonizaron. En la **tabla 5** se muestran las características de los pacientes en función de su estado de portador rectal por *P. aeruginosa*.

La prevalencia de colonización al ingreso en la UCI fue del 27% (112/414 pacientes); de ellos 89 (22%) estaban colonizados por cepas no-MDR, 6 (1%) por cepas MDR no-XDR y 17 (4%) por XDR. La prevalencia de colonización durante el ingreso en la UCI fue del 22% (67/302 pacientes): 43 (14%) por cepas no-MDR, 11 (4%) por MDR no-XDR y 13 (4%) por XDR.

Se analizó la dinámica de colonización rectal por *P. aeruginosa* en los 97 episodios que se colonizaron en la UCI (67 episodios sin colonización previa y 30 episodios en pacientes que durante la UCI presentaron una segunda colonización por *P. aeruginosa* por una cepa fenotípicamente diferente a la previa). En la **figura 22** se muestra la dinámica de colonización rectal por *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia antimicrobiana. A los diez días de ingreso en la UCI la probabilidad de colonización fue el 44% para cepas no-MDR y del 24% tanto para las MDR no-XDR como para las cepas XDR (log Rank, p=0.02).

Table 5. Epidemiological characteristics of the 414 ICU patients included in the study.

Characteristics	Results at ICU admission for patients with:		
	<i>P. aeruginosa</i> colonization (n=112)	No <i>P. aeruginosa</i> colonization (n=302)	<i>P</i>
Age (mean ±SD) (yr)	65.3±13.3	62.2 ±14.3	0.049
Male sex (no. [%])	78 (69)	186 (61)	0.13
Prior hospital stay			
No. (%)	74 (66)	136 (45)	<0.001
Days (median [IQR])	5 (2–12)	2 (0-7)	<0.001
Charlson index (mean ± SD)	2.7 ± 1.9	2.5 ± 2.1	0.40
SAPS II score (mean ± SD)	45.8 _ 14.5	43.0 _ 13.0	0.059
Prior antibiotic exposure (no. [%])			
Fluoroquinolones	18 (16)	61 (20)	0.34
Group 2 carbapenems	20 (18)	73 (24)	0.17
Group 1 carbapenems	7 (6)	20 (7)	0.89
Aminoglycosides	4 (4)	20 (7)	0.24
Colistin	2 (2)	10 (3)	0.41
Aztreonam/antipseudomonal cephalosporin	12 (11)	32 (11)	0.97
Non-antipseudomonal cephalosporins	7 (6)	46 (15)	0.015
Antipseudomonal penicillins	17 (15)	104 (34)	<0.001
Non-antipseudomonal penicillins	33 (29.5)	89 (29.5)	0.99
Glycopeptides	11 (10)	48 (16)	0.11
Total days prior antibiotics (median [IQR])	9 (2–22)	10.5 (4-21)	0.22

IQR, Interquartile range.

Figura 22. Probability of *Pseudomonas aeruginosa* digestive tract colonization.

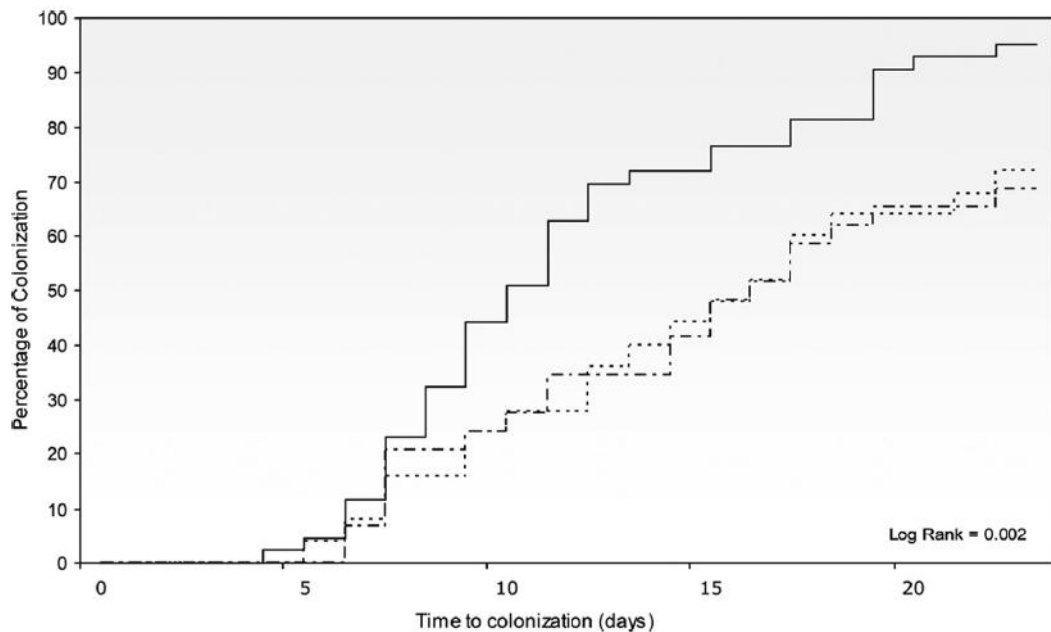


Figura 22. Abbreviations: Solid line, no-MDR *P. aeruginosa* colonization; dotted-dashed line, MDR non-XDR *P. aeruginosa* colonization; dotted line, XDR *P. aeruginosa* colonization.

Con el objetivo de interpretar mejor la epidemiología de la colonización por *P. aeruginosa* en nuestro medio, se realizaron estudios genotípicos mediante PFGE y MLST. Los estudios de PFGE se realizaron en todos los aislamientos de *P. aeruginosa* MDR (37 MDR no-XDR y 46 XDR) y en 23 pacientes que presentaban inicialmente colonización por una cepa de *P. aeruginosa* no-MDR y que durante el ingreso se habían colonizado por *P. aeruginosa* MDR (18 MDR no-XDR y 5 XDR) para analizar si existía concordancia clonal entre la cepa inicial no-MDR y la posterior cepa MDR. Los estudios de MLST se realizaron en los dos clones mayoritarios identificados en el estudio. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- La PFGE de los 37 aislamientos de cepas de *P. aeruginosa* MDR no-XDR mostro que 13 de los aislamientos fueron policlonales, mientras que 19 presentaban idéntico patrón por PFGE que fue identificado mediante MLST como el clon de alto riesgo ST-111.

- La PFGE de los 46 aislamientos de XDR demostraron la existencia de un clon epidémico que fue identificado mediante MLST como el clon de alto riesgo ST-175.
- El estudio de las 23 parejas de cepas demostró que:
 - o De los 18 pacientes colonizados inicialmente con no-MDR y posteriormente con MDR no-XDR, en 10 las cepas aisladas en el mismo paciente fueron clonalmente idénticas; mientras que en los otros 8 pares restantes fueron discordantes genéticamente y pertenecían al clon epidémico ST-111.
 - o En los cinco pacientes colonizados inicialmente por cepas no-MDR y posteriormente por cepas XDR no existió relación clonal entre ambas cepas, siendo identificadas los cinco aislamientos de *P. aeruginosa* XDR con el clon epidémico de alto riesgo ST-175 mediante técnicas de MLST.

OBJETIVO 2. Analizar el impacto de la colonización intestinal por *P. aeruginosa* en desarrollo posterior de infección: evaluar el posible valor de la colonización intestinal como predictor de infección por *P. aeruginosa*.

Artículo 2. Prospective observational study of prior rectal colonization status as a predictor for subsequent development of *Pseudomonas aeruginosa* clinical infections.

Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Cañizares R, Periche E, Dominguez MA, Ariza J, Peña C.

Antimicrob Agents Chemother. 2015 Sep;59(9):5213–5219.

En el **artículo 2** se estudió el papel de la colonización intestinal en la patogénesis de la infección por *P. aeruginosa*. Se incluyeron de forma prospectiva 414 pacientes de UCI con vigilancia activa semanal de colonización intestinal, de los cuales 179 (43%) presentaron muestras rectales para *P. aeruginosa* durante el ingreso en la UCI. En el mismo periodo ocurrieron 97 episodios de infección por *P. aeruginosa* en 77 pacientes (14 pacientes presentaron dos episodios de infección y 3 pacientes 3 episodios). La incidencia global de infección por *P. aeruginosa* durante el estudio fue de 19% (77/414). Entre los 77 pacientes que desarrollaron infección, 69 (90%) tuvieron colonización intestinal previa por *P. aeruginosa* mientras que 8 pacientes (10%) no la presentaron (5 pacientes sin colonización intestinal durante todo el ingreso y 3 pacientes en las que la colonización rectal se identificó con posterioridad a la infección). La proporción de infección fue de 39% en los pacientes colonizados mientras que del 3.4% en los no-colonizados ($p < 0.001$). En los 69 pacientes que habían presentado colonización previa a la infección, se realizaron estudios genotípicos que demostraron que en 60 (87%) casos existía concordancia entre los aislamientos rectales y los de las muestras clínicas.

El análisis de supervivencia Kaplan-Meier mostró diferencias significativas en la probabilidad de desarrollar infección por *P. aeruginosa* entre pacientes colonizados y no colonizados, como se observa en la **figura 23**. La probabilidad de infección por *P. aeruginosa* a los 14 días del ingreso en la UCI fue del 26% para pacientes con colonización rectal por *P. aeruginosa*, frente a un 5% en pacientes no colonizados (log rank, $P < 0.001$).

Figure 23. Surviving curves showing the probability developing *Pseudomonas aeruginosa* infection based on rectal colonization status.

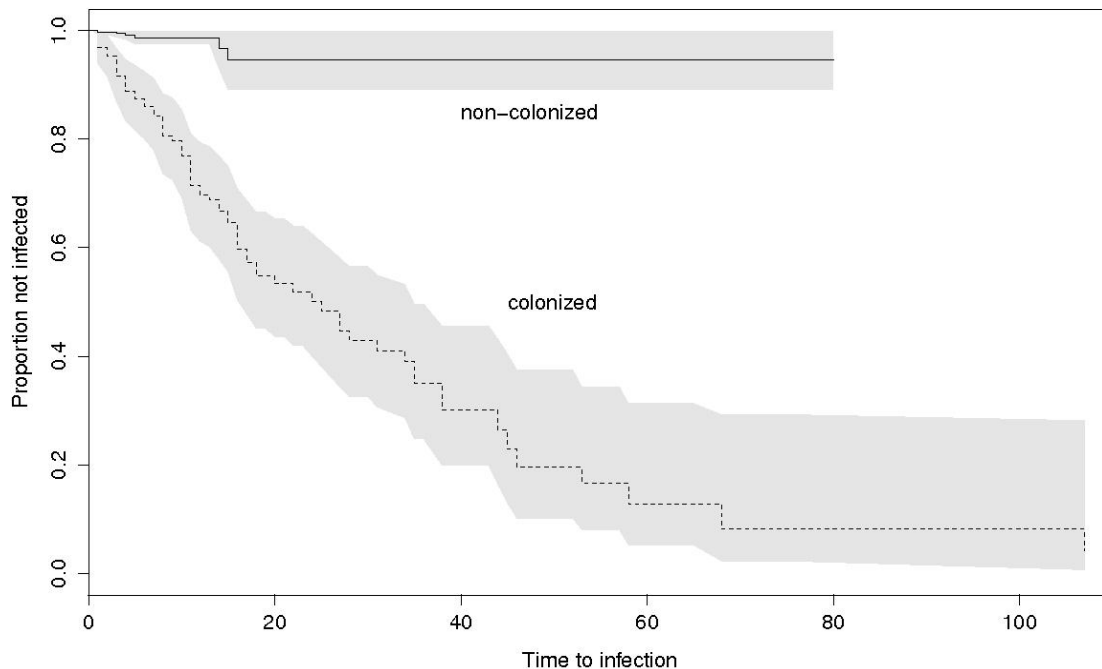


Figure 23. The start of the risk period was defined as the ICU admission. Solid line, non-colonized patients; dashed line, PA-colonized patients. The areas of 95% confidence intervals of both groups are shown.

Al ajustar en un modelo de regresión de Cox por los posibles factores de confusión, la colonización intestinal previa por *P. aeruginosa* fue el principal factor asociado al desarrollo de infección por *P. aeruginosa* (aHR, 15.23; 95% IC, 6.9-33.7; $P < 0.001$). En la tabla 2 del artículo 2 (**anexo I**) se puede observar las características de los pacientes en función de la presencia o no de infección y las variables analizadas como posibles predictoras de infección en el modelo de regresión de Cox.

OBJETIVO 3. Determinar el impacto de la exposición a antibióticos en la colonización e infección por cepas de *P. aeruginosa* multirresistente y extremadamente resistentes.

Artículo 1. Antibiotic pressure is a major risk factor for rectal colonization by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients.

Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Periche E, Cañizares R, Dominguez MA, Ariza J, Peña C.

Antimicrob Agents Chemother. 2014 Oct; 58(10): 5863-5870

Artículo 3. Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk of bloodstream infection in hospitalized patients.

Peña C, **Gómez-Zorrilla S**, Suarez C, Domínguez MA, Tubau F, Arch O, Oliver A, Pujol M, Ariza J.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Oct;31(10):2791–7.

En el artículo 1 se analizaron los factores de riesgo relacionados con la adquisición de colonización intestinal por *P. aeruginosa* MDR (tanto por cepas MDR no-XDR como por cepas XDR). Se incluyeron 450 episodios en 414 pacientes de UCI: 235 pacientes sin colonización intestinal por *P. aeruginosa* y 179 pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, de los cuales 34 pacientes presentaron durante el ingreso colonización por cepas con diferente perfil de resistencia (36 episodios). De los 215 episodios de colonización 132 fueron por *P. aeruginosa* no-MDR y 83 por *P. aeruginosa* MDR (37 por MDR no-XDR y 46 por XDR). En el análisis de regresión de Cox ajustado se identificaron como variables independientes asociadas a la colonización por *P. aeruginosa* MDR la severidad de la enfermedad de base (Charlson ≥ 3), el uso previo de quinolonas y de carbapenémicos del grupo 1 y 2 tal y como se observa en la **tabla 6**.

Table 6. Cox regression analysis of risk factors for MDR *P. aeruginosa* intestinal colonization in ICU patients: impact of exposure to antibiotic therapy.

Characteristic	Crude analysis:		Adjusted analysis	
	cHR ^a (95% CI)	P	aHR (95% CI)	P
Age > 65 yr	1.11 (0.72–1.73)	0.63	1.38 (0.86–2.19)	0.17
Male gender	1.20 (0.94–1.52)	0.13	1.20 (0.94–1.54)	0.14
SAPS score at ICU admission (>40)	1.53 (0.79–2.37)	0.054	1.26 (0.79–2.02)	0.32
Charlson index of ≥ 3	1.96 (1.26–3.04)	0.003	1.97 (1.22–3.18)	0.006
Prior hospital stay	1.15 (0.75–1.78)	0.52		
Prior fluoroquinolones ^b	1.02 (1.00–1.04)	0.013	1.02 (1.00–1.04)	0.039
Prior aminoglycosides ^b	1.02 (0.94–1.12)	0.59		
Prior carbapenems ^b	1.04 (1.01–1.07)	0.007	1.03 (1.00–1.07)	0.041
Prior ertapenem ^b	1.08 (1.03–1.14)	0.002	1.08 (1.02–1.14)	0.004
Prior colistin ^b	1.03 (0.99–1.07)	0.11	1.03 (0.99–1.08)	0.12
Prior antipseudomonal cephalosporins ^b	1.01 (0.98–1.05)	0.37		
Prior other cephalosporins ^b	1.00 (0.98–1.03)	0.58		
Prior piperacillin-tazobactam ^b	0.98 (0.94–1.00)	0.13	0.98 (0.95–1.01)	0.29
Prior penicillin ^b	1.00 (0.99–1.02)	0.64		
Prior glycopeptides ^b	0.99 (0.97–1.01)	0.53		

Table 6. ^a cRH, crude hazard ratio; ^b Antibiotics per day.

En el **artículo 3** se analizaron los **factores de riesgo asociados al desarrollo de bacteriemia por *P. aeruginosa* XDR y por *P. aeruginosa* MDR no-XDR**. Se incluyeron de forma retrospectiva 151 episodios de bacteriemias nosocomiales que ocurrieron en nuestro centro durante los años 2006 y 2007. La **tabla 7** muestra las características epidemiológicas de los pacientes en función del perfil de resistencia antibiótica de *P. aeruginosa*.

Los factores identificados al comparar las **bacteriemias causadas por *P. aeruginosa* XDR** con las producidas por cepas no-MDR en el estudio univariante fueron: la presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (37% vs. 12%; p=0.002), una mayor estancia hospitalaria previa (20.95±19.13 vs. 14.53±13.23; p=0.032) y el uso previo de fluoroquinolonas (50% vs. 21.5%; p=0.004). Al ajustar con un análisis de regresión logística se identificó el consumo de fluoroquinolonas como único factor de riesgo independiente asociado al desarrollo de bacteriemia por *P. aeruginosa* XDR (OR 2.80; 95% IC 1.02-7.70).

Los factores de riesgo asociados al desarrollo de **bacteriemia por *P. aeruginosa* MDR no-XDR** respecto a las producidas por cepas no-MDR fueron: una mayor comorbilidad, un ingreso previo más prolongado y una mayor exposición a antibióticos, tal y como se muestra en la **tabla 6**. En el análisis ajustado, se identificaron como factores de riesgo independientes para el desarrollo de bacteriemia por *P. aeruginosa* MDR no-XDR la gravedad de la comorbilidad de base (Charlson>3) (OR 8.2; IC 95% 1-34-50.2; p=0.002) y los días de exposición previa a antibióticos (OR 1.1; IC 95% 1.02-1.20; p=0.01).

Table 7. Epidemiological characteristics of nosocomial bacteremia due to MDR *P. aeruginosa*

Characteristic	non-MDR	XDR	P	MDR XDR	non- P
Age	65.06±13.88	64.70±13.29	0.55	64.85±17.92	0.35
Male gender	67 (70.5)	37 (86)	0.057	7 (54)	0.22
Days between admission and bacteremia	14.53±13.23	20.95±19.13	0.032	23.15±20.31	0.026
ICU stay	37 (39)	20 (46.5)	0.45	6 (46)	0.61
Charlson index>3	20 (21)	15 (35)	0.08	7 (54)	0.01
Underlying conditions					
Any	76 (80)	37 (86)	0.47	11 (85)	0.51
Chronic pulmonary disease	12 (13)	16 (37)	0.002	6 (46)	0.002
Solid malignancy	19 (20)	11 (26)	0.50	3 (23)	0.52
Diabetes	18 (19)	9 (21)	0.81	4 (31)	0.46
Immunosuppressive therapy	19 (20)	12 (28)	0.37	2 (15)	0.51
Cardiopathy	21 (22)	5 (12)	0.16	2 (15)	0.44
Chronic renal failure	17 (18)	7 (16)	0.81	4 (31)	0.22
Hematologic malignancy	4 (4)	4 (9)	0.25	0	-
Neurologic disease	16 (17)	5 (12)	0.61	0	-
Neutropenia	3 (3)	1 (2)	0.78	1 (8)	0.40
Cirrhosis	6 (6)	6 (4)	0.19	1 (8)	0.60
AIDS	2 (2)	1 (2)	0.93	0	-
Polymicrobial bacteremia	27 (28)	8 (19)	0.29	5 (38.5)	0.45
Clinical intervention					
Venous catheter	72 (76)	35 (81)	0.93	8 (61.5)	0.27
Urinary catheter	66 (69.5)	36 (84)	0.078	7 (54)	0.25
Mechanical ventilation	31 (33)	18 (42)	0.33	5 (38.5)	0.67
Prior surgery	49 (52)	21 (49)	0.085	6 (46)	0.71
Prior antibiotics	64 (67)	38 (88)	0.009	13 (100)	0.015
Amoxicillin–clavulanic acid	37 (57)	16 (42)	0.15	7 (54)	0.83
Piperacillin–tazobactam	14 (21.5)	14 (37)	0.092	6 (46)	0.064
Carbapenems	8 (12)	8 (21)	0.26	3 (23)	0.30
Fluoroquinolones	14 (21.5)	19 (50)	0.004	3 (23)	0.90
Aminoglycosides	5 (8)	7 (18)	0.10	3 (23)	0.095
Cephalosporins	8 (12)	7 (18)	0.40	1 (8)	0.63
Antipseudomonic cephalosporins	7 (11)	4 (10.5)	0.96	1 (8)	0.73
Days of prior antibiotics	15.20±9.4	20.74±12.5	0.039	28.00±24.67	0.004
Clinical samples colonization	56 (59)	32 (74)	0.08	10 (77)	0.20
Number of samples					
1-2 samples	42 (44)	21 (49)			
3-4 samples	8 (8.5)	6 (14)			
≥5 samples	6 (6)	5 (12)			
Clinical samples origin					
Urine	28 (29.5)	21 (49)	0.002	5 (38.5)	0.50
Respiratory tract	26 (27)	15 (35)	0.37	7 (54)	0.05
Wound	6 (6)	6 (14)	0.14	2 (15)	0.24
Catheter	15 (16)	10 (23)	0.30	3 (21)	0.50
Primary bacteremia	44 (46)	21 (49)	0.80	6 (46)	0.99
Vascular catheter	37	14		4	
Unknown	7	7		2	
Secondary bacteremia	51 (54)	22 (51)		7 (54)	
Urinary	28	13		3	
Intra-abdominal	14	2		2	
Respiratory	8	6		2	
Others	1	1		0	

OBJETIVO 4. Evaluar la influencia de la multirresistencia en la capacidad de producir infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

Artículo 3. Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk of bloodstream infection in hospitalized patients.

Peña C, **Gómez-Zorrilla S**, Suarez C, Domínguez MA, Tubau F, Arch O, Oliver A, Pujol M, Ariza J.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Oct;31(10):2791–7.

Artículo 2. Prospective observational study of prior rectal colonization status as a predictor for subsequent development of *Pseudomonas aeruginosa* clinical infections.

Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Cañizares R, Periche E, Dominguez MA, Ariza J, Peña C.

Antimicrob Agents Chemother. 2015 Sep;59(9):5213–5219.

En el **artículo 3** se evaluó mediante un estudio retrospectivo las posibles diferencias en la capacidad de producir bacteriemia en función del patrón de resistencia antimicrobiano de *P. aeruginosa*. Un total de 2.131 pacientes hospitalizados en el Hospital Universitari de Bellvitge presentaron alguna muestra clínica con *P. aeruginosa* durante el periodo 2006-2007 : 1657 pacientes con cepas no-MDR y 474 con MDR (209 MDR no-XDR y 265 XDR). En el mismo periodo se detectaron 151 bacteriemias por *P. aeruginosa* adquiridas en el medio hospitalario: 95 (63%) bacteriemias por cepas no-MDR, 13 (9%) por MDR no-XDR y 43 (28%) por *P. aeruginosa* XDR.

Tal y como se muestra en la **tabla 8**, la frecuencia de bacteriemia fue superior en los pacientes con aislamientos de *P. aeruginosa* XDR que aquellos con cepas no-MDR [43 (16%) vs. 95 (6%); $p < 0.001$, OR 3.1, IC 95% 2.10-4.74]. Sin embargo, no hubo diferencias en la capacidad de producir bacteriemia al comparar los grupos de *P. aeruginosa* no-MDR y MDR no-XDR [95 (6%) vs. 13 (6%); $p = 0.74$, OR 1.09, IC 95% 0.69-1.99].

Tabla 8. Proporción de bacteriemias en pacientes con aislamientos de *P. aeruginosa* según el perfil de resistencia antibiótica de las cepas.

Perfil de resistencia	Nº muestras clínicas	Nº Bacteriemias	% Bacteriemia	PFGE
no-MDR	1657	95	6%	No epidémico
MDR no-XDR	209	13	6%	No epidémico
XDR	265	43	16%	Epidémico

Tabla 8. no-MDR, no multirresistente; MDR no-XDR, multirresistente no extremadamente resistente; XDR, extremadamente resistente.

Los estudios genotípicos demostraron la naturaleza clonal de las cepas con fenotipo XDR, de forma que dos clones epidémicos (el ST-175 y en menor medida el ST-111) representaban

prácticamente la totalidad de los aislamientos de XDR, mientras que los otros fenotipos (no-MDR y MDR no-XDR) eran poblaciones policlonales. La naturaleza epidémica clonal de las cepas XDR pudo explicar su mayor capacidad de desarrollar bacteriemias.

Para paliar las limitaciones del estudio retrospectivo, se realizó un estudio prospectivo, **artículo 2**, con el objetivo de evaluar las diferencias en la invasividad clínica de *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia antibiótica. Para ello evaluamos el tiempo que tardaban los pacientes en desarrollar infección desde su colonización intestinal.

Se incluyeron en el estudio 414 pacientes, objetivándose 97 episodios de infección por *P. aeruginosa* en 77 pacientes. En la **tabla 9** se muestra el foco de infección en función del perfil de resistencia antimicrobiana. Las cepas XDR presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al foco de infección al compararse con los otros fenotipos, presentando un mayor porcentaje de infecciones relacionadas con dispositivos intravasculares o urinarias en relación a sondaje vesical (6 pacientes [30%] en *P. aeruginosa* XDR vs. 4 pacientes [7%] en las cepas no-XDR; $p=0.016$). Los análisis genotípicos demostraron la existencia de una diseminación clonal entre las cepas XDR, debido al clon epidémico ST-175.

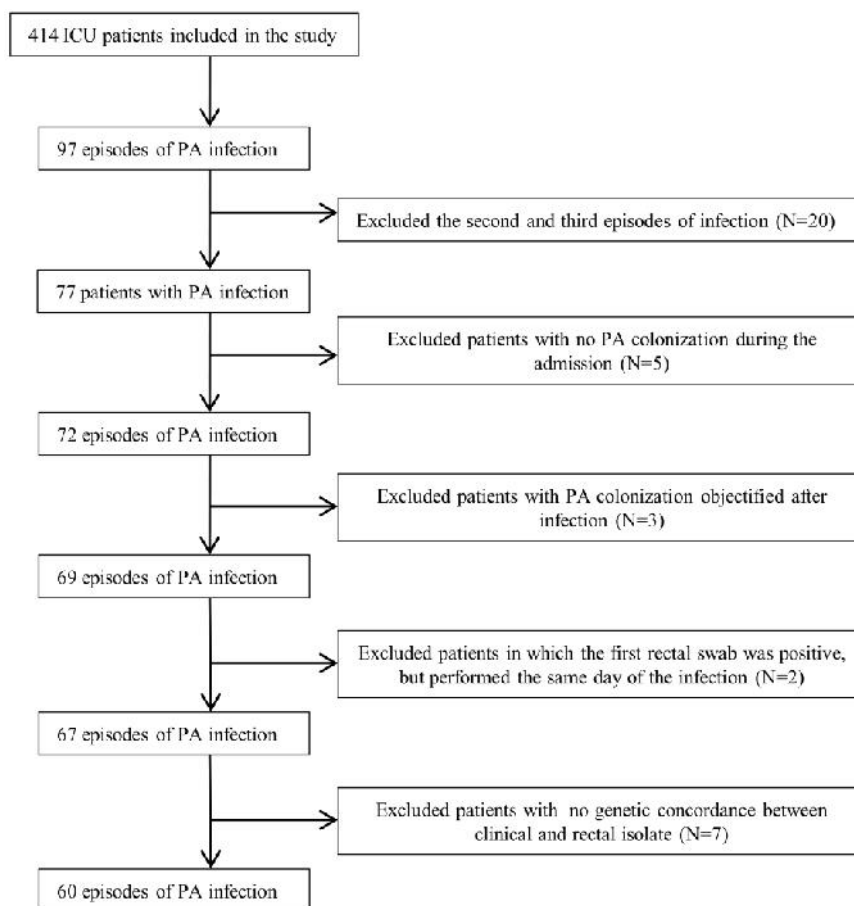
Tabla 9. Origen de la infección en función del perfil de resistencia de *P. aeruginosa*.

Foco de la infección	Perfil de resistencia antibiótica de <i>P. aeruginosa</i>		
	no-MDR 45(58%)	MDR no-XDR 12 (16%)	XDR 20 (26%)
Respiratorio	34 (76%)	10 (84%)	12 (60%)
Urinario	-	-	2 (10%)
Catéter vascular	3 (7%)	1 (8%)	4 (20%)
Abdominal	2 (4%)	1 (8%)	1 (5%)
Osteoarticular	1 (2%)	-	-
Otros focos	5 (11%)	-	1 (5%)

Tabla 9. no-MDR, no multirresistente; MDR no-XDR, multirresistente no extremadamente resistente; XDR, extremadamente resistente.

Para poder estudiar la invasividad clínica, se incluyeron únicamente los episodios de infección que presentaban colonización intestinal previa y en los que existía concordancia genotípica entre la muestra rectal y el aislamiento clínico. Tal y como se muestra en la **figura 24**, solo 60 episodios cumplieron estos criterios y se incluyeron en los estudios de invasividad clínica.

Figure 24. Flow diagram of *P. aeruginosa* (PA) clinical infection selection process, indicating episodes.



En la **figura 25.a** se muestra la dinámica de infección de *P. aeruginosa* en función del perfil de resistencia. Dado que el fenotipo XDR estaba representado únicamente por el clon epidémico ST-175 con características epidemiológicas especiales y más relacionado con la transmisión exógena, realizamos un subanálisis que incluyó únicamente las cepas policlonales (cepas no-

MDR y MDR no-XDR). La probabilidad de infección a los 14 días de la colonización fue del 26% para las cepas de *P. aeruginosa* no-MDR mientras que del 16% para las cepas MDR no-XDR, como se observa en la **figura 25. b**. Estos resultados mostraron una tendencia a la significación estadística (log rank=0.13).

Figura 25. Invasividad clínica de *P. aeruginosa* en función del perfil de resistencia antibiótica.

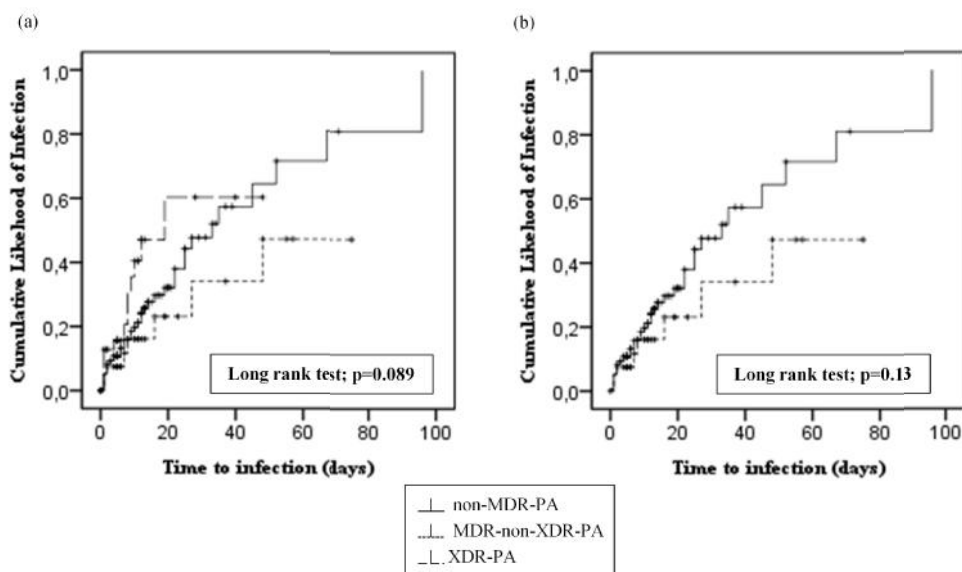


Figure 25. Kaplan Meier curve between (a) non-MDR (non multidrug-resistant), MDR non-XDR (Multidrug-resistant non extensively drug resistant) and XDR (extensively drug resistant) PA (*Pseudomonas aeruginosa*) and (b) non-MDR and MDR non-XDR PA. The origin of the risk period was defined as beginning of rectal colonization by PA.

Tras controlar los posibles factores de confusión en modelo ajustado de regresión de Cox, se continuó observando una tendencia estadística a que las cepas de *P. aeruginosa* no-MDR se asociaran a un mayor riesgo de infección que las cepas MDR no-XDR (aHR 1.75; 95%CI 0.81-3.8; P=0.15).

OBJETIVO 5. Analizar la respuesta inflamatoria clínica y molecular de pacientes con infección por *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia.

Artículo 4. Acute inflammatory response of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infections: a prospective study.

Gómez-Zorrilla S, Morandeira F, Castro MJ, Tubau F, Periche E, Cañizares R, Dominguez MA, Ariza J, Peña C.

Microb Drug Resist. 2016 Oct 18. [Epub ahead of print]

Se incluyeron 69 episodios de infecciones agudas por *P. aeruginosa* en pacientes críticos. 48 episodios fueron infecciones del tracto respiratorio (tres de ellas con bacteriemia) y 18 episodios de bacteriemias. Entre los 6 episodios restantes se incluyeron 3 episodios de infección intraabdominal, dos episodios de infección del sistema nervioso central y un episodio de mediastinitis. La mortalidad precoz fue superior en pacientes con infección por *P. aeruginosa* no-MDR (16%) que en aquellos con cepas MDR (10% en infecciones por MDR no-XDR y 8% en XDR), aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Los biomarcadores de respuesta inflamatoria fueron superiores en las infecciones por *P. aeruginosa* XDR que en las infecciones por cepas no-MDR al inicio de la infección, tanto las interleuquinas IL-6 y IL-10 ($p=0.002$) como la procalcitonina ($p=0.038$); tal y como se muestra en la **tabla 10**. Hubo también un mayor número de episodios de shock séptico en las infecciones XDR que en las causadas por cepas no-MDR ($p=0.002$). La **tabla 10** también recoge los datos de la respuesta inflamatoria clínica y molecular en los episodios de infección bacteriemia. En estos, no se objetivaron diferencias en la progresión a sepsis entre los diferentes fenotipos de *P. aeruginosa*. Sin embargo, los fenotipos no-MDR y XDR presentaron un mayor porcentaje de pacientes que progresaron a sepsis que el fenotipo MDR no-XDR. En cuanto a las infecciones del tracto respiratorio, los valores de IL-6 fueron superiores en las infecciones por *P. aeruginosa* no-MDR que en las MDR no-XDR, con diferencias cercanas a la significación estadística [$p=0.006$]. Los valores de procalcitonina fueron significativamente superiores en los episodios por cepas XDR que en los causados por cepas no-MDR ($p=0.05$).

A las 48 horas de la infección los niveles de procalcitonina permanecieron más elevados en las infecciones por cepas XDR que en las producidas por no-MDR ($p=0.03$). En ese punto horario, los niveles de IL-6 fueron superiores en las infecciones no-MDR que en las MDR no-XDR ($p=0.002$).

Table 10. Episodes of *P. aeruginosa* infection: Clinical and Molecular inflammatory response.

Characteristic	non-MDR n=40 (%)	MDR non-XDR n=12 (%)	P*	XDR PA n=17(%)	P**
Origin of infection					
High risk origin	38 (95)	10 (83)	0.22	14 (82)	0.12
Unknown	3	0		1	
Respiratory tract	29	10		9	
Abdominal	3	0		3	
Other(s)	3	0		1	
Low risk origin	2 (5)	2 (17)	0.22	3 (18)	0.12
Vascular catheter	1	2		2	
Urinary tract	0	0		1	
Pancreatobiliary	1	0		0	
SAPS score at infection¹	47.1±14.8	44.6±12.7	0.60	56.5±17.6	0.04
Bacteremia	8 (20)	3 (25)	0.70	7 (41)	0.09
Initial presentation					
Pitt score ²	3 (2-5.5)	1 (0-1)	0.15	6 (6-6)	0.22
IL-6 ²	360 (44-945)	93 (64-93)	0.50	183 (53-789)	0.78
IL-10 ²	11.7(0.2-22.7)	13.5 (3.8-13.4)	1.00	11.8 (2.8-19.6)	1.00
Procalcitonin ²	3.75(1.45-11)	0.77 (0.5-0.77)	0.08	2.99 (1.2-18.6)	0.96
CRP ²	241(67-361)	34 (21-337)	0.19	191 (87-394)	0.95
Sepsis (any severity)	7 (87.5)	2 (66.7)	0.49	6 (85.7)	0.73
48h after bacteremia					
Pitt score ²	0 (0-5.3)	0	-	3.5 (1.5-4.0)	0.91
IL-6 ²	52 (25-167)	60 (22-170)	0.63	36 (25-138)	0.66
IL-10 ²	1.15(0.2-11.9)	7.7 (3.3-12.9)	0.19	7.21 (0.5-13.2)	1.00
Procalcitonin ²	2.42(1.2-9.3)	0.83 (0.4-0.9)	0.50	1.39 (0.5-5.81)	0.96
CRP ²	174(79-298)	43 (17-198)	0.78	84 (51-303)	0.62
Sepsis (any severity)	4 (50)	1 (33)	0.58	5 (83.5)	0.24
Initial Clinical presentation					
Sepsis	6 (15)	4 (33)	0.21	0	-
Severe sepsis	8 (20)	1(8)	0.66	2 (12)	0.70
Shock	9 (22.5)	2 (17)	0.50	11 (65)	0.002
MODS	3 (7.5)	0	-	4 (23.5)	0.18
Initial Molecular response					
IL-6 ²	77 (34-216)	38 (24-86)	0.15	430 (67-951)	0.02
IL-10 ²	1.3 (0-3.9)	2.7 (0-11.8)	0.41	3.3 (1.5-16.3)	0.02
Procalcitonin ²	0.3 (0.1-1.0)	0.3 (0.1-2.4)	0.70	1.1 (0.6-5.2)	0.008
CRP ²	191 (79-305)	103 (41-184)	0.12	202 (56-332)	0.83
Clinical presentation at 48h					
Sepsis	2 (5)	0	-	2 (25)	0.05
Severe sepsis	5 (13)	1 (8)	0.56	6 (37.5)	0.03
Shock	6 (15)	1 (8)	0.47	2 (12.5)	0.57
MODS	2 (5)	1 (8)	0.56	0	-
Molecular Response at 48h					
IL-6 ²	58 (30-104)	19 (15-49)	0.02	86 (31-324)	0.33
IL-10 ²	1.7 (0-7.5)	2.9 (0.7-7.8)	0.60	2.9 (0.7-7.8)	0.52
Procalcitonin ²	0.2 (0.1-17)	0.9 (0.5-4.1)	0.96	0.9 (0.5-4.1)	0.03
CRP ²	96 (47-256)	124 (41-299)	0.14	124 (41-299)	0.5

Table 10. MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively-drug resistant; ICU, intensive care unit; MODS, multiorgan dysfunction syndrome; IL, interleukin; CRP, C-Reactive Protein. **p*, comparison non-MDR and MDR non-XDR. ***p*, comparison non-MDR and XDR. ¹, data expressed as mean [Standard deviation]; ² data expressed as median (IQR).

La media de todos los biomarcadores analizados fue significativamente superior en los pacientes que presentaron fallo multiorgánico al inicio y a las 48 horas de la infección, salvo en el caso de la IL-10 (**tabla 11**).

Table 11. Inflammatory response according to acute organ dysfunction.

	At onset			48 hours		<i>p</i>
	No organ dysfunction (n=11)	Organ dysfunction (n=58)	<i>p</i>	No organ dysfunction (n=18)	Organ dysfunction (n=49)	
IL-6	20 (11-53)	104 (42-435)	<0.001	28 (12-49)	66 (32-162)	<0.001
IL-10	0.2 (0-1.7)	2.5 (0.06-9)	0.003	1.5 (0-4.2)	2.4 (0-8.3)	0.72
Procalcitonin	0.1 (0.006-0.8)	0.5 (0.2-3.2)	0.001	0.3 (0.1-0.7)	0.5 (0.1-1.8)	0.02
CRP	62 (22.4-129)	200 (91-317)	0.003	74 (20.4-144)	97 (44-299)	0.01

Table 11. Data are expressed as median (Interquartile range). IL, interleukin; CRP, C-Reactive Protein.

Las infecciones bacteriémicas presentaron también unos niveles de biomarcadores más elevados que las no bacteriémicas, como se muestra en la **tabla 12**.

Table 12. Inflammatory response according to bloodstream infection.

	At onset			48 hours		<i>p</i>
	No bacteremia (n=51)	Bacteremia (n=18)	<i>p</i>	No bacteremia (n=51)	Bacteremia (n=18)	
IL-6	66 (29-199)	202 (61-688)	0.03	51 (25-111)	46 (25-145)	0.93
IL-10	1.5 (0-3.3)	13(1.4-21.7)	0.003	1.9 (0-5.5)	4 (0.6-12.7)	0.13
Procalcitonin	0.3 (0.1-0.9)	3 (0.9-8.8)	<0.001	0.2 (0.1-0.9)	2 (0.5-3.9)	<0.001
CRP	137 (75-280)	183 (50-340)	0.08	84 (38-219)	92 (52-297)	0.39

Table 12. Data are expressed as median (Interquartile range). IL, interleukin; CRP, C-Reactive Protein.

La procalcitonina fue el único marcador que se asoció con la mortalidad precoz [0.4 (0.1-1.6) en sobrevivientes vs. 2 (0.4-5.7) en no sobrevivientes; p=0.050].

OBJETIVO 6. Estudiar el impacto de la multirresistencia de *P. aeruginosa* en el pronóstico de las neumonías asociadas a la ventilación mecánica.

Artículo 5. Impact of multidrug resistance on *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia outcome: predictors of early and crude mortality.

Peña C, **Gómez-Zorrilla S**, Oriol I, Tubau F, Dominguez MA, Pujol M, Ariza J.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Mar;32(3):413–20.

Se recogieron de forma retrospectiva 91 episodios de neumonía asociada a ventilación mecánica por *P. aeruginosa* ocurridos en el Hospital Universitari de Bellvitge durante un periodo de 6 años (2006-2011): 31 (34%) fueron causados por cepas de *P. aeruginosa* no-MDR y 60 (66%) por cepas MDR, de los cuales 42 (70%) presentaban perfil XDR.

Las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes se muestran en la **Tabla 13**. Las neumonías causadas por *P. aeruginosa* MDR se asociaron a una mayor duración de la ventilación mecánica, a una mayor estancia en la UCI, a un retraso del tratamiento antibiótico adecuado y a una mayor comorbilidad. Sin embargo, esto no fue acompañado de una mayor mortalidad.

Las neumonías provocadas por *P. aeruginosa* no-MDR recibieron tratamiento adecuado en mayor medida que las causadas por bacterias con perfil de MDR, tanto en el tratamiento empírico (68% vs. 30%; $p < 0.001$) como en el tratamiento definitivo (96% vs. 50%; $p < 0.001$). No obstante, presentaron tendencia a una mayor mortalidad precoz que aquellas causadas por cepas MDR (29% vs. 15%; $p = 0.06$).

Table 13. Characteristics of patients with *P. aeruginosa* ventilator-associated pneumonia (VAP).

Characteristics	Non-MDR <i>P. aeruginosa</i> n=31 (34%)	MDR <i>P. aeruginosa</i> n= 60 (66%)	P
Age (mean±SD)	55.84±15.56	62.9±12.3	0.02
Male sex	25 (81)	44 (73)	0.44
ICU admission to VAP (days, median, IQR)	11 (7-22)	26 (13-45)	0.01
MV ^a to VAP (days, median, IQR)	10 (5-17)	17 (9-43)	0.03
VAP <i>P. aeruginosa</i> bacteraemia	2 (6.5)	5 (8)	1.0
Non-VAP <i>P. aeruginosa</i> bacteraemia	3 (10)	3 (5.5)	0.41
Other organisms bacteraemia	1 (3)	4 (7)	0.65
Charlson index (median, IQR)	1 (1-4)	2 (1-3.75)	0.007
Underlying condition (any)	18 (58)	51 (85)	0.004
Solid malignancy	4 (13)	17 (28)	0.12
Haematologic malignancy	2 (6.5)	4 (7)	1.0
Diabetes	4 (13)	20 (33)	0.04
Cardiopathy	6 (19)	14 (23)	0.66
COPD ^b	8 (25)	18 (30)	0.67
Chronic renal failure	2 (6.5)	7 (12)	0.71
Neurologic disease	3 (10)	10 (17)	0.53
Cirrhosis	1 (3)	6 (10)	0.41
Neutropaenia	1 (3)	0	-
Immunosuppressive therapy	4 (13)	25 (42)	0.008
SAPS ^c score on admission (mean±SD)	40.23±13.2	39.05±13.03	0.68
Prior aerosolized colistin	1 (3)	21 (35)	0.001
Prior parenteral colistin	0	3 (5)	-
Clinical presentation			
Shock	17 (55)	29 (48)	0.27
MODS ^d	7 (23)	18 (30)	0.45
SAPS score at diagnosis (mean±SD)	57.19±9.03	53.83±14.1	0.23
Antimicrobial empiric therapy	31 (100)	57 (95)	0.20
Adequate empiric therapy	21 (68)	17 (30)	<0.001
Adequate combined therapy	10 (33)	4 (7)	0.004
Antimicrobial definitive therapy	28 (90)	60 (100)	0.01
Adequate definitive therapy	27 (96)	30 (50)	<0.001
Delay in adequate treatment (mean±SD)	1.28±0.45	1.69±0.46	<0.001
Clinical outcome			
Clinical cure	12 (39)	27 (45)	0.28
Clinical improvement	7 (39)	6 (10)	0.06
Clinical failure	12 (39)	23 (38)	0.48
Recurrence	0	4 (7)	-
Microbiological outcome			
Eradication	9 (38)	11 (23)	0.17
Persistence	14 (58)	36 (75)	0.24
Recurrence	0	1 (2)	-
Outcome			
Early mortality	9 (29)	9 (15)	0.06
Crude mortality	17 (55)	30 (50)	0.33

Table 13. ^a MV, Mecanical ventilation; ^b COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease; ^c SAPS, Simplified Acute Physiologic Score; ^d MODS, Multiorgan Dysfunction syndrome.

La multirresistencia no se asoció a mayor mortalidad precoz ni tardía en los análisis de regresión logística tal y como se puede observar en las tablas 2 y 3 del artículo 5. En el modelo ajustado los únicos factores asociados a mortalidad precoz fueron el fallo multiorgánico (OR 10.4; 95% CI 1.7-63.5; $p=0.011$) y el tratamiento empírico adecuado (OR 4.27; 95%CI 0.98-18.4; $p=0.052$). El fallo multiorgánico (OR 4.31;95%CI 1-14-16.2; $p=0.03$) fue la única variable independiente asociada a mortalidad tardía.

OBJETIVO 7. Investigar la influencia del genotipo de secreción tipo III (SSTT) y del patrón de resistencia en la mortalidad de las infecciones bacteriémicas por *Pseudomonas aeruginosa*.

Artículo 6. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections.

Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A. for the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).

Clin Infect Dis. 2015 Feb 15;60(4):539–48.

El genotipo del sistema de secreción tipo III (SSTT) es considerado uno de los principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa*. En este estudio se analizó su relación con el patrón de resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* y con el pronóstico de la bacteriemia. Para ello se realizó un análisis de una cohorte prospectiva multicéntrica de bacteriemias por *P. aeruginosa*. Se incluyeron 590 pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa*. Todos los aislamientos fueron positivos para *exoU* [126 (21%)] o para *exoS* [443 (75%)], excepto 21 (3.5%) cepas que fueron negativas para los dos genotipos. La presencia de *exoT* y *exoY* fue documentada en prácticamente todos los aislamientos [591 (98%) y 556 (95%) respectivamente], por lo que no se incluyeron en el análisis. De los 590 episodios, 422 (71%) presentaron un perfil no-MDR [280 (47%) multiS y 142 (24%) moderadamente resistentes]. Los restantes 168 episodios (29%) presentaron perfil MDR [87 (15%) MDR no-XDR y 81 (14%) MDR XDR]. Las características basales de los pacientes en función del genotipo SSTT se muestran en la **tabla 14**.

Table 14. Baseline characteristics of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia according to type III Secretion System Genotype.

Characteristic	<i>exoU</i> ⁺	<i>exoS</i> ⁺	<i>P</i> ^a	<i>exoU/exoS</i> ⁻	<i>P</i> ^b
	(n=126)	(n=443)		(n=21)	
Age (yr, mean±SD)	65.0 ± 16.90	65.3 ± 16.4	0.88	59.6 ± 21.84	0.19
Male sex	86 (68)	301 (68)	0.95	15 (71)	0.77
Acquisition					
Nosocomial	74 (59)	254 (57)	0.39	16 (76)	0.06
Healthcare related	48 (38)	167 (37)	0.46	3 (14)	0.01
Community	4 (3)	22 (5)	0.07	2 (10)	0.12
<i>P.aeruginosa</i> phenotype					
Non-MDR	104 (82.5)	297 (67)	0.001	21 (100)	0.03
Susceptible	56 (44)	209 (47)	0.58	15 (71)	0.02
Moderately resistant	48 (38)	88 (20)	<0.001	6 (29)	0.40
MDR	22 (17.5)	146 (33)	0.001	0	-
Non-XDR	18 (14)	69 (16)	0.72	0	-
XDR	4 (3)	77 (17)	<0.001	0	-
ICU stay	30 (24)	121 (27)	0.43	6 (29)	0.64
SAPS score (mean±SD)	47.3±19.4	42.3±17.5	0.17	44.5±15.0	0.74
Charlson index (median-IQR)	3 (1-4)	2 (2-5)	0.80	2 (1-3)	0.09
Underlying condition					
Diabetes	41 (32.5)	110 (25)	0.08	5 (24)	0.42
Chronic lung disease	16 (13)	68 (15)	0.46	2 (9.5)	1.00
Heart disease	26 (21)	77 (17)	0.40	4 (19)	1.00
Solid malignancy	37 (29)	126 (28)	0.84	6 (29)	0.94
Hematologic malignancy	14 (11)	74 (17)	0.12	2 (9.5)	1.00
Chronic renal failure	25 (20)	66 (15)	0.18	3 (14)	0.76
Chronic neurologic disease	10 (8)	31 (7)	0.72	0	-
Cirrhosis	6 (5)	21 (5)	0.99	2 (9.5)	0.32
Immunosuppression	30 (24)	118 (27)	0.52	4 (19)	0.78
Neutropenia	5 (4)	25 (6)	0.46	2 (9.5)	0.26
Origin of bacteremia					
High-risk bacteremia	57 (45)	217 (49)	0.46	9 (43)	0.84
Unknown	31 (25)	123 (28)	0.49	7 (33)	0.43
Respiratory tract	9 (7)	54 (12)	0.11	2 (9.5)	0.66
Abdominal	10 (8)	15 (3)	0.02	0	-
Soft tissue	4 (3)	16 (4)	0.82	0	-
Other(s)	3 (2)	9 (2)	0.81	0	-
Low-risk bacteremia	69 (55)	226 (51)	0.46	12 (57)	0.84
Vascular catéter	26 (21)	82 (18.5)	0.58	6 (29)	0.45
Urinary tract	39 (31)	116 (26)	0.27	5 (24)	0.47
Pancreaticobiliary	4 (3)	28 (6)	0.27	1 (5)	0.55
Clinical presentation					
Pitt score, (median, IQR)	1 (0-3)	1 (0-3)	0.47	1 (0-3)	0.78
Shock initial	26 (21)	83 (19)	0.63	5 (24)	0.74
MODS initial	14 (11)	45 (10)	0.75	3 (14)	0.71
Shock/MODS at 48h	4 (3)	27 (6)	0.27	0	-
Outcome					
Late mortality (30-day)	34 (27)	133 (30.5)	0.47	8 (38)	0.31
Early mortality (5-day)	25 (73.5)	62 (47)	0.005	6 (75)	0.93

Table 14. ^a *exoU*⁺ vs. *exoS*⁺; ^b *exoU* vs. *exoU/exoS*⁻.

Impacto del genotipo SSTT en la mortalidad.

La mortalidad a los 30 días fue del 30% (175 pacientes) y de ellos el 53% (93 pacientes) fallecieron en los primeros 5 días. La mortalidad tardía no se asoció con el genotipo SSTT, tal y como se muestra en la **figura 26** en la que las curvas de supervivencia Kaplan-Meier comparan pacientes con bacteriemia con genotipo *exoU*⁺ vs. *exoU*⁻. Sin embargo, al estudiar la asociación del genotipo SSTT con la mortalidad precoz **figura 27** se objetivó que esta era superior en los pacientes con genotipo *exoU*⁺, siendo la supervivencia a los 5 días del 31.4% (IC 95% 17.4-49.4) para los pacientes con aislamientos *exoU*⁺ y del 53.2% para aquellos con aislamientos *exoU*⁻ (IC 95%, 44.6-61.5) (log rank; $p=0.002$).

Figura 26. Probability estimate for 30-day mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia according to type III secretion system *exoU* genotype.

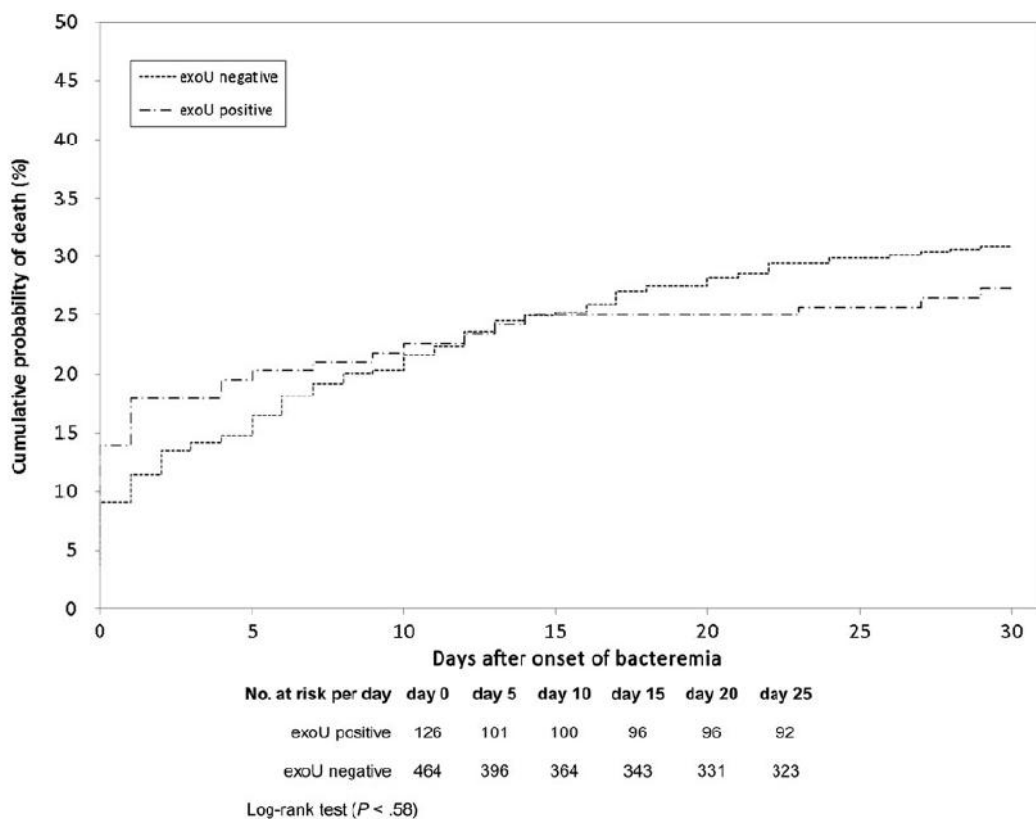
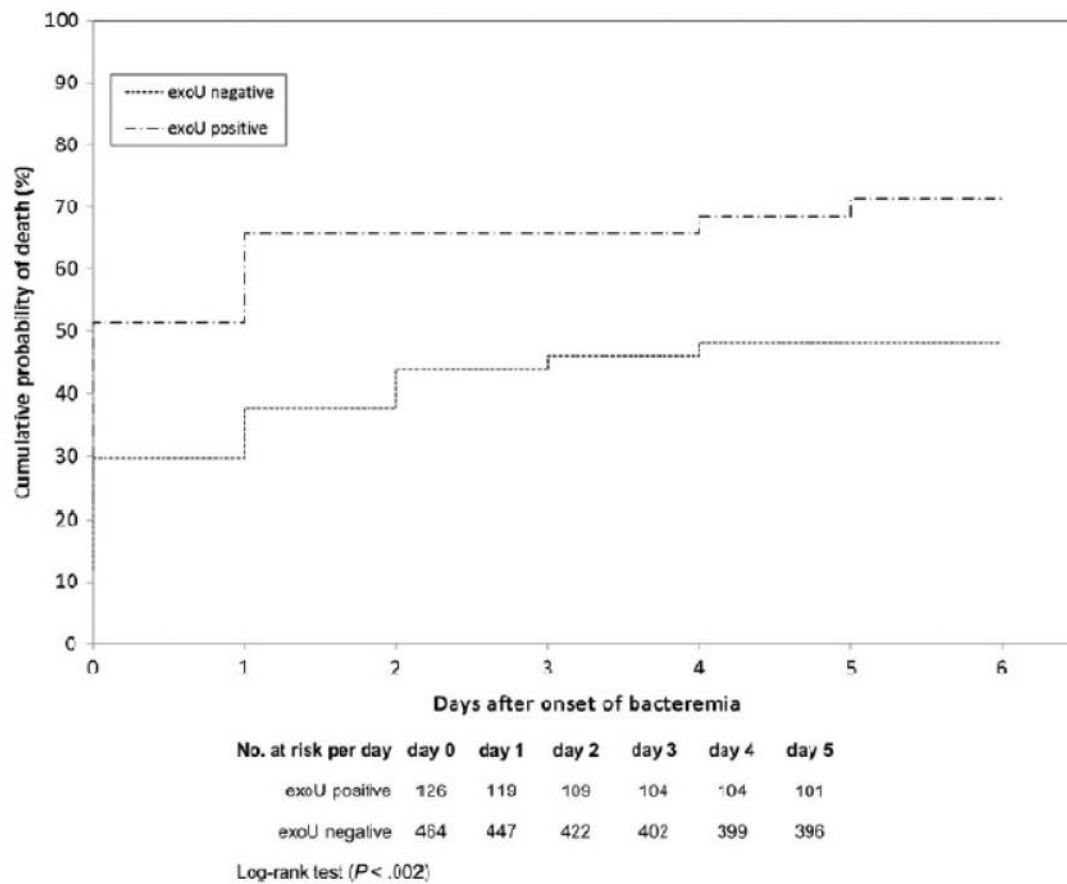


Figura 27. Probability estimate for 5-day mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia according to type III secretion system *exoU* genotype.



Tras realizar un modelo de regresión de Cox para ajustar por los posibles factores de confusión, el genotipo *exoU^r* se asoció de forma significativa con la mortalidad precoz [aHR, 1.90 (95% CI 1.15-3.14); $p=0.01$], pero no con la mortalidad tardía (tablas 15 y 16).

Table 15. Cox Regression analysis of predictor factors for early mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection.

Variables	Crude Analysis		Adjusted Analysis	
	cHR (95% CI)	P	aHR (95% CI)	P
Age >65y	0.95 (.62–1.45)	0.81	1.16 (.72–1.88)	0.53
Sex Male	1.28 (.82–2.00)	0.27	1.35 (.83–2.20)	0.22
Non-MDR <i>P. aeruginosa</i>	1.23 (.79–1.90)	0.34		
TTSS <i>exo U</i>	1.81 (1.24–3.16)	0.004	1.90 (1.15–3.14)	0.01
Charlson index ≥ 3	1.77 (1.13–2.78)	0.011	2.01 (1.21–3.34)	0.007
High-risk bacteremia	2.51 (1.44–4.39)	0.012	1.94 (1.06–3.52)	0.03
Immunosuppression	1.03 (.68–1.56)	0.89		
Pitt bacteremia score ≥ 2	3.63 (1.97–6.67)	<0.001	2.86 (1.44–5.69)	0.003
Initial shock	1.96 (1.30–2.96)	0.001	0.83 (.49–1.39)	0.48
Initial MODS	1.79 (1.15–2.75)	0.010	0.93 (.55–1.59)	0.80
Shock/MODS 48h	2.59 (1.62–4.15)	<0.001	2.47 (1.42–4.29)	0.001
Adequate empiric antibiotic	0.89 (.57–1.39)	0.62		

Table 15. Abbreviations; MDR, multidrug resistant; MODS, multiorgan dysfunction syndrome; TTSS, type III secretion system.

Table 16. Cox regression analysis of predictor factors for 30-Day mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection.

Variables	Crude Analysis		Adjusted Analysis	
	cHR (95% CI)	P	aHR (95% CI)	P
Age >65y	1.52 (1.12-2.08)	0.008	1.94 (1.39-2.70)	<0.001
Sex Male	1.04 (0.75-1.42)	0.81	0.89 (0.64-1.24)	0.41
MDR <i>P. aeruginosa</i>	1.42 (1.04-1.93)	0.026	1.40 (1.01-1.94)	0.04
TTSS <i>exo U</i>	0.90 (0.62-1.30)	0.58		
Charlson index ≥ 3	1.71 (1.26-2.32)	<0.001	2.22 (1.56-3.16)	<0.001
High-risk source of bacteremia	2.99 (2.17-4.12)	<0.001	2.22 (1.56-3.16)	<0.001
Immunosuppression	1.90 (1.40-2.58)	<0.001	1.24 (0.89-1.72)	0.20
Pitt bacteremia score ≥ 2	4.14 (2.99-5.75)	<0.001	2.10 (1.46-3.04)	<0.001
Shock/MODS 48h	7.3 (5.36-9.96)	<0.001	5.29 (3.67-7.61)	<0.001
Adequate empiric antibiotic	1.33 (0.71-2.49)	0.44		

Table 16. Abbreviations; MDR, multidrug resistant; MODS, multiorgan dysfunction syndrome; TTSS, type III secretion system.

Asociación del genotipo SSTT con el patrón de resistencia de *P. aeruginosa*.

El genotipo *exoS* se identificó en 209 (75%) de los aislamientos multiS, en 88 (62%) de los moderadamente resistentes, en 69 (79%) de los MDR no-XDR y en 77 (95%) de los XDR. El genotipo *exoU* se detectó en 56 (20%) de los aislamientos multiS, en 48 (34%) de los moderadamente resistentes, el 18 (21%) de los MDR no-XDR y en 4 (5%) de los XDR (**tabla 14**).

En las cepas con perfil MDR, el genotipo *exoS* fue más frecuente que el *exoU* ($p=0.001$). Dentro del fenotipo MDR, los aislamientos con genotipo *exoU* fueron especialmente poco frecuentes en las cepas XDR (3% vs. 17%; $p<0.001$). Los fenotipos no-MDR presentaron una mayor proporción de aislamientos con genotipo *exoU* [104 (26%)] que los fenotipos MDR (**tabla 14**).

Por lo tanto, el determinante de virulencia *exoU* se asoció positivamente con los fenotipos moderadamente resistentes (resistencia a 1 o 2 familias de fármacos antipseudomónicos), mientras que presentaba una asociación negativa con los fenotipos XDR. Los estudios moleculares demostraron una diversidad clonal dentro del fenotipo moderadamente resistente, por lo que dichos hallazgos no se explicarían por la presencia de un clon epidémico. Sin embargo, al analizar con MLST los 81 aislamientos XDR se objetivó que la mayoría pertenecían a clones epidémicos de alto riesgo; así 62 aislamientos correspondían al ST-175, 9 al ST-111, 2 al ST-235 y 2 al ST-244. De estos clones de alto riesgo, únicamente el ST-235 mostró genotipo *exoU+*, explicando así la relación negativa entre dicho genotipo y el patrón fenotípico XDR.

Impacto del perfil de resistencia de *P. aeruginosa* en la mortalidad.

Al analizar el impacto del patrón de resistencia en la mortalidad tardía mediante un análisis de supervivencia Kaplan-Meier se observó que ésta era superior en pacientes con infección por cepas MDR que en aquellos con infección no-MDR como muestra la **figura 28** (log-rank=0.02). Tras ajustar con un análisis de Cox por las posibles variables confusoras, el patrón de multirresistencia continuaba asociándose de forma independiente con la mortalidad tardía [aHR, 1.40 (95% CI, 1.01-1.94)] como se observa en la **tabla 16**. Sin embargo, al evaluar el impacto de la multirresistencia en la mortalidad precoz (primeros 5 días) ésta fue superior en las cepas no-MDR aunque sin alcanzar la significación estadística (log-rank=0.28), tal y como se observa en **figura 29**.

Figure 28. Probability estimate for 30-days mortality of *P. aeruginosa* bacteremia according to resistance phenotype.

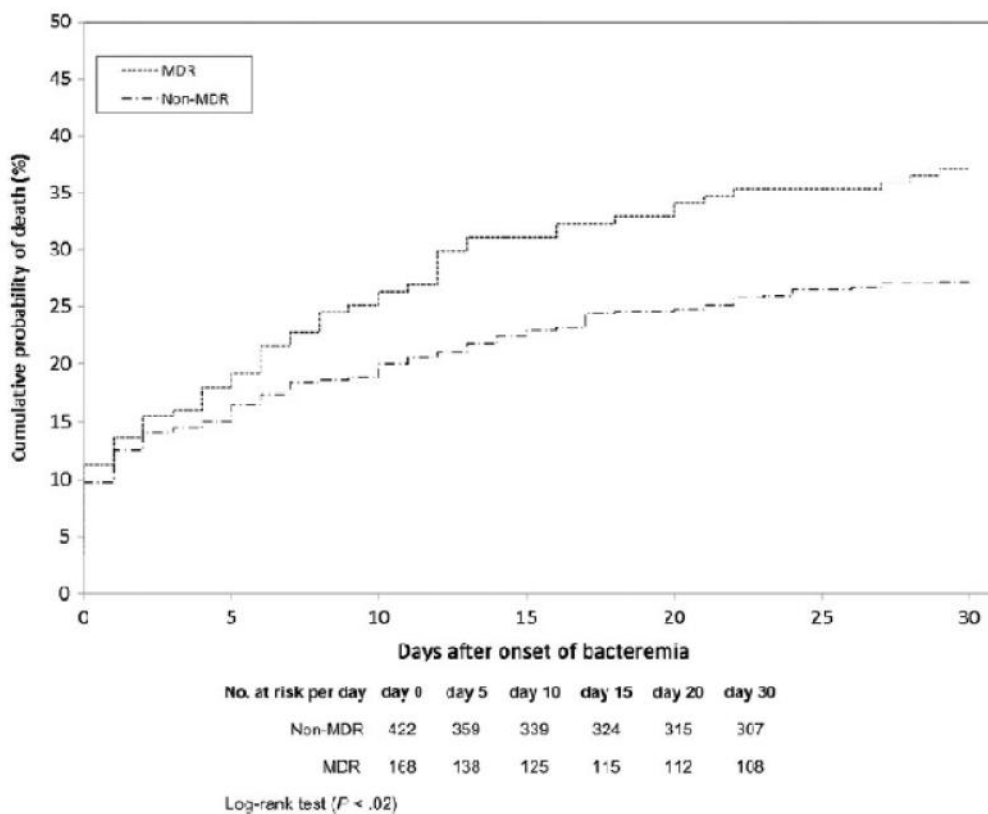
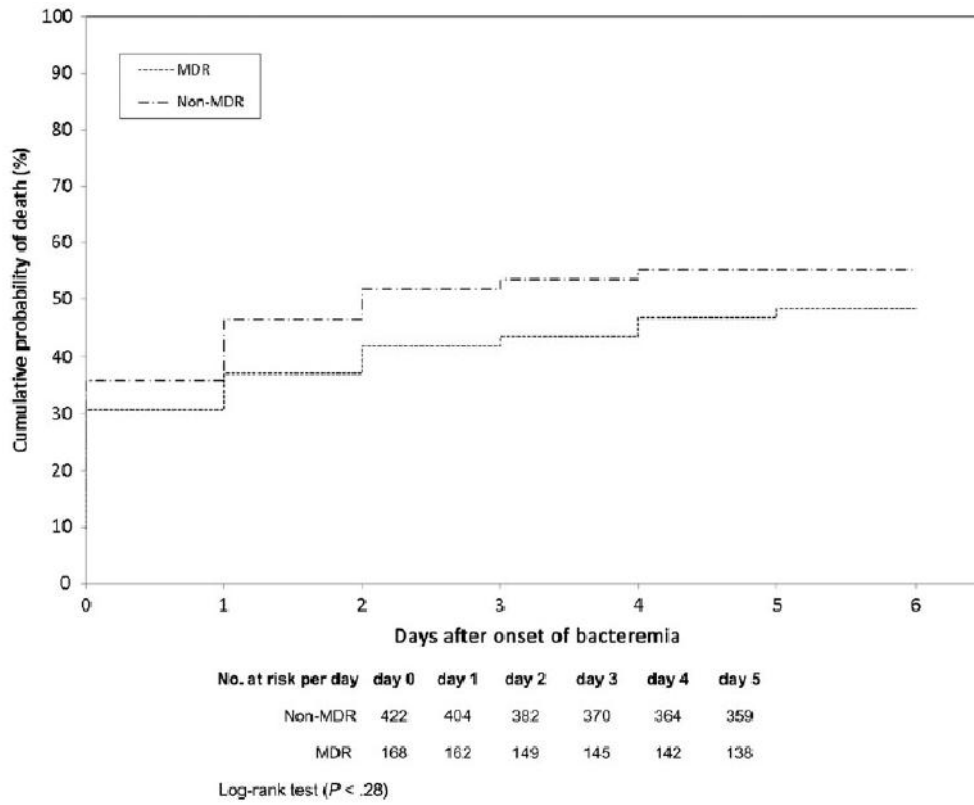


Figure 29. Probability estimate for 5-day mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia according to resistance phenotype.



OBJETIVO 8. Estudiar los principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* y evaluar su expresión en función del perfil de resistencia antibiótica.

Artículo 7. Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: *in vitro* and *in vivo* studies.

Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F, Dominguez MA, Oliver A, Ariza J, Peña C.

Int J Antimicrob Agents. 2016 May;47(5):368–74.

Se analizaron las diferencias en la expresión de los principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia en nueve cepas (dos de referencia y siete clínicas) con diferentes fenotipos, genotipos y mecanismos de resistencia. La tipificación molecular (PFGE y MLST) de estas cepas, así como su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos y sus mecanismos de resistencia están detallados en la **tabla 4 (página 44)**.

Se objetivó un crecimiento bacteriano *in vitro* menor en las cepas resistentes que en las sensibles (**tabla 17**). Así, el tiempo de duplicación fue inferior en las cepas clínicas no-MDR que en las cepas clínicas MDR/XDR (0.42 ± 0.08 h vs. 0.55 ± 0.14 h; $P = 0.023$). Entre las cepas de *P. aeruginosa* con perfil MDR, se objetivó una tendencia a la significación estadística al comparar las cepas MDR no-XDR con las cepas XDR (0.62 ± 0.13 h vs. 0.48 ± 0.14 h; $P = 0.06$).

En cuanto al estudio genotípico del sistema de secreción tipo III, los genes *exoT* y *exoY* fueron detectados en todas las cepas, mientras que los genes *exoS* y *exoU* fueron mutuamente excluyentes. La **tabla 17** muestra, que todas las cepas clínicas estudiadas, con la excepción de la ST-235, presentaron genotipo *exoS*⁺/*exoU*⁻. El clon ST-235 además se asoció a una mayor citotoxicidad e invasividad. Sin embargo, los otros clones de alto riesgo estudiados (ST-111 y ST-175) presentaron un genotipo *exoU*⁻ y sus valores de citotoxicidad e invasividad no fueron superiores a los de las otras cepas clínicas como se puede observar en la **tabla 17**.

Table 17. *In vitro* results.

Strain, ST	Resistant Profile	<i>In vitro</i> studies				
		Duplication time* (h)	TTSS genotype		Cytotoxicity**	Invasiveness ^{b*}
			ExoS	ExoU		
(1), PAO1	multiS	0.48 ± 0.14	P	N	10.3 ± 2.62	100.0± 33.8
(2), PA14	multiS	0.52 ± 0.11	N	P	84.3 ± 0.13	8.9± 3.2
(3), ST17	multiS	0.38 ± 0.07	P	N	11.9 ± 0.15	2322.9± 135.4
(4), ST381	multiS	0.42 ± 0.10	P	N	14.0 ± 0.09	991.0± 81.2
(5), ST1707	multiS	0.46 ± 0.08	P	N	6.8 ± 0.03	272.2± 29.6
(6), ST274	MDR	0.61 ± 0.09	P	N	11.3 ± 1.48	105.4± 13.9
(7), ST111	MDR	0.64 ± 0.15	P	N	11.0 ± 0.13	100.0± 35.4
(8), ST235	XDR	0.46 ± 0.09	N	P	19.0 ± 0.20	2426.0± 677.1
(9), ST175	XDR	0.48 ± 0.19	P	N	11.7± 0.18	234.1± 78.0

Table 17. * Mean± Standard deviation; ** Median (IQR). Abbreviations: TTSS, Type III secretion system; P, positive; N, negative^a The percentage of cytotoxicity was calculated relative to the value for the maximum-LDH-release control. ^b Invasiveness was calculated as the relative value (taking PAO1 as reference) of the total numbers of internalized bacteria per well.

OBJETIVO 9. Estudiar el impacto de la multirresistencia de *P. aeruginosa* en la capacidad de producir mortalidad en un modelo experimental animal.

Artículo 7. Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: *in vitro* and *in vivo* studies.

Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F, Dominguez MA, Oliver A, Ariza J, Peña C.

Int J Antimicrob Agents. 2016 May;47(5):368–74.

Mediante un modelo animal de peritonitis-sepsis en ratón C57/BL6 se evaluaron las diferencias en la supervivencia utilizando nueve cepas de *P. aeruginosa* con diferente patrón de resistencia (tabla 4, página 44). Se utilizaron 90 animales, repartidos en grupos de 10 animales y a cada grupo se inoculó una cepa de *P. aeruginosa* diferente. Se realizó seguimiento durante 7 días, todas las muertes (44 animales) se produjeron en las primeras 48 h. Los resultados del estudio de supervivencia están representados mediante curvas de Kaplan-Meier en la figura 30.

Figura 30. Análisis de supervivencia de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* en un modelo experimental de peritonitis en ratón.

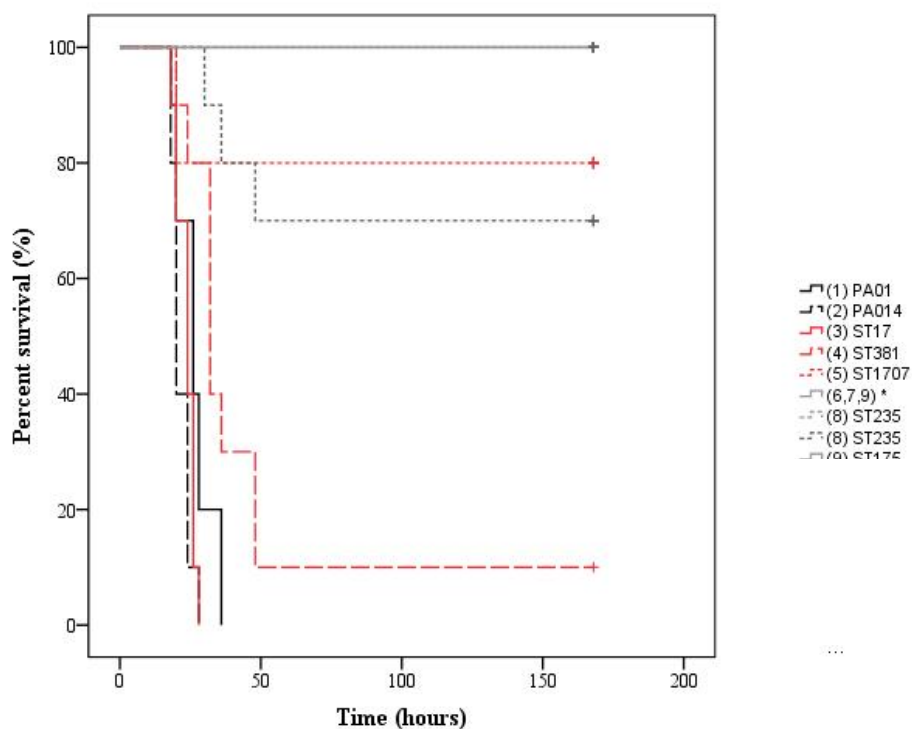


Fig. 30. Survival analysis comparing nine groups of mice (n = 10) infected with *Pseudomonas aeruginosa* (PA) isolates using a murine sepsis/peritonitis model. Survival curves show the probability of mortality based on the strain of PA inoculated. Black lines, reference strains; red lines, clinical susceptible strains; grey lines, clinical MDR/XDR strains. * This line represents strain 6 (ST274), strain 7 (ST111) and strain 9 (ST175) without any loss and therefore overlap. MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant.

Los ratones inoculados con cepas clínicas multisensibles presentaron una probabilidad de mortalidad a las 48 horas del 70% mientras que en aquellos inoculados con cepas MDR la probabilidad de mortalidad fue del 7.5% ($p < 0.001$, Log-rank). Los ratones inoculados con cepas de referencia presentaron una mortalidad del 100% en las primeras 48 horas. Entre las cepas de *P. aeruginosa* MDR, el clon epidémico de alto riesgo ST-235 (cepa 8) fue la única capaz de producir mortalidad, pero en un porcentaje (30%) inferior a la mortalidad producida por cepas sensibles (70%).

OBJETIVO 10. Analizar el impacto de la multirresistencia de *P. aeruginosa* en la capacidad de producir enfermedad y respuesta inflamatoria en un modelo experimental animal.

Artículo 7. Understanding the acute inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infections: Differences between susceptible and multidrug-resistance strains in a mouse peritonitis model.

Gómez-Zorrilla S, Calatayud L, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F, Dominguez MA, Oliver A, Ariza J, Peña C.

Aceptado el 3 de octubre del 2016 para su publicación en International Journal of Antimicrobial Agents.

Mediante un modelo de peritonitis-sepsis en ratón se analizó la respuesta inflamatoria en la infección aguda por *P. aeruginosa* y se evaluaron las diferencias en dicha respuesta en función del patrón de resistencia de las cepas. Se incluyeron nueve cepas de *P. aeruginosa* (**tabla 4**, pág. 44) incluyendo tres clones epidémicos de alto riesgo (ST-111, ST-175 y ST-235). En cada punto horario (4h, 8h y 12h) se estudiaron las principales interleuquinas pro- y anti-inflamatorias en suero (TNF- α , IL-6 e IL10); la presencia de bacteriemia y los recuentos leucocitarios y bacterianos en líquido peritoneal. Se analizaron un total de 145 animales (grupos de cinco animales por punto horario-cepa y otro grupo de 10 animales de control sin infección).

En general, los niveles de las tres interleuquinas estudiadas fueron superiores en las cepas clínicas sensibles que en las cepas multirresistentes (**figura 31**). Los niveles de TNF- α fueron superiores en las cepas clínicas sensibles que en las MDR en todos los puntos horarios [453.38 (368.50-565.00) vs. 232.44 (186.84-272.81), $p= 0.001$ a las 4h; 392.98 (265.20-1021.84) vs. 156.08 (106.09-291.11), $p=0.003$ a las 8h; y 436.56 (67.96-2351.02) vs. 79.10(48.43-191.78) a las 12h ; $p= 0.004$]. En cuanto a la IL-6, no hubo diferencias significativas al comparar ambos perfiles de resistencia a las 4 horas; pero sí a las 8 horas [51601.60 (2681-61600) vs. 4751.06 (1985.55-11198.33); $p=0.036$] y 12 horas después de la inoculación [29292.00 (2617.84-61600) vs. 731.67(224.14-8480.00); $p= 0.007$]. Respecto a los niveles de IL-10 fueron superiores en el grupo de las cepas clínicas sensibles en todos los puntos horarios [1661.34 (1074.92-2357.64) vs. 995.88 (665.41-1729.95), $p= 0.014$ a las 4h; 1659.34 (841.26-2117.88) vs. 638.56 (442.89-992.49), $p= 0.001$ a las 8h; y 524.46 (174.30-1798.20) vs. 97.42 (44.55-173.34) a las 12h ; $p< 0.001$]. La respuesta inflamatoria, medida como elevación de citoquinas, producida por los clones epidémicos de alto riesgo fue inferior que la producida por cepas sensibles. Dentro los clones epidémicos, el ST-235 tuvo unos niveles más elevados de las tres citoquinas estudiadas

y un patrón temporal más semejante a las cepas sensibles, aunque con una respuesta inflamatoria inferior que la de las cepas sensibles como se observa en la figura.

Los datos de los recuentos bacterianos y leucocitarios en líquido peritoneal y de la capacidad de producir bacteriemia en función de la cepa de *P. aeruginosa* inoculada y del punto horario se muestran en la **tabla 18**. Los recuentos bacterianos en el líquido peritoneal fueron superiores en las cepas clínicas sensibles que en las multirresistentes a las 8 horas [6.00 (4.30-6.90) vs. 4.46 (3.30-5.34; $p=0.005$)] y a las 12 horas de la inoculación bacteriana [7.75 (4.00-7.97) vs. 4.04 (2.58-4.94; $p=0.003$)]. En cuanto a la capacidad de producir bacteriemia, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos perfiles de resistencia. Sin embargo, a las 12 horas de la inoculación, los ratones infectados por cepas clínicas sensibles presentaron un mayor porcentaje de bacteriemia que aquellos infectados por cepas multirresistentes [13(87%) vs. 12(60%); $p=0.087$].

Los ratones inoculados con cepas sensibles presentaron mayores recuentos leucocitarios en líquido peritoneal al inicio de la infección que aquellos inoculados por cepas multirresistentes [3.60×10^6 (3.04×10^6 - 5.60×10^6) vs. 2.42×10^6 (1.47×10^6 - 2.87×10^6); $p=0.008$]. Sin embargo, a medida que evolucionaba la infección el reclutamiento leucocitario en el líquido peritoneal fue disminuyendo en el grupo inoculado por cepas sensibles llegando a presentar leucopenia a las 12 horas de la inoculación, mientras que en el grupo inoculado por cepas multirresistentes los recuentos leucocitarios permanecieron elevados [1.84×10^6 (1.32×10^6 - 6.00×10^6) vs. 5.08×10^6 (2.99×10^6 - 9.10×10^6); $p=0.06$].

Figure 31. Temporal pattern of cytokine release in serum (expressed as pg/mL) during *P. aeruginosa* infection in a mouse peritonitis model.

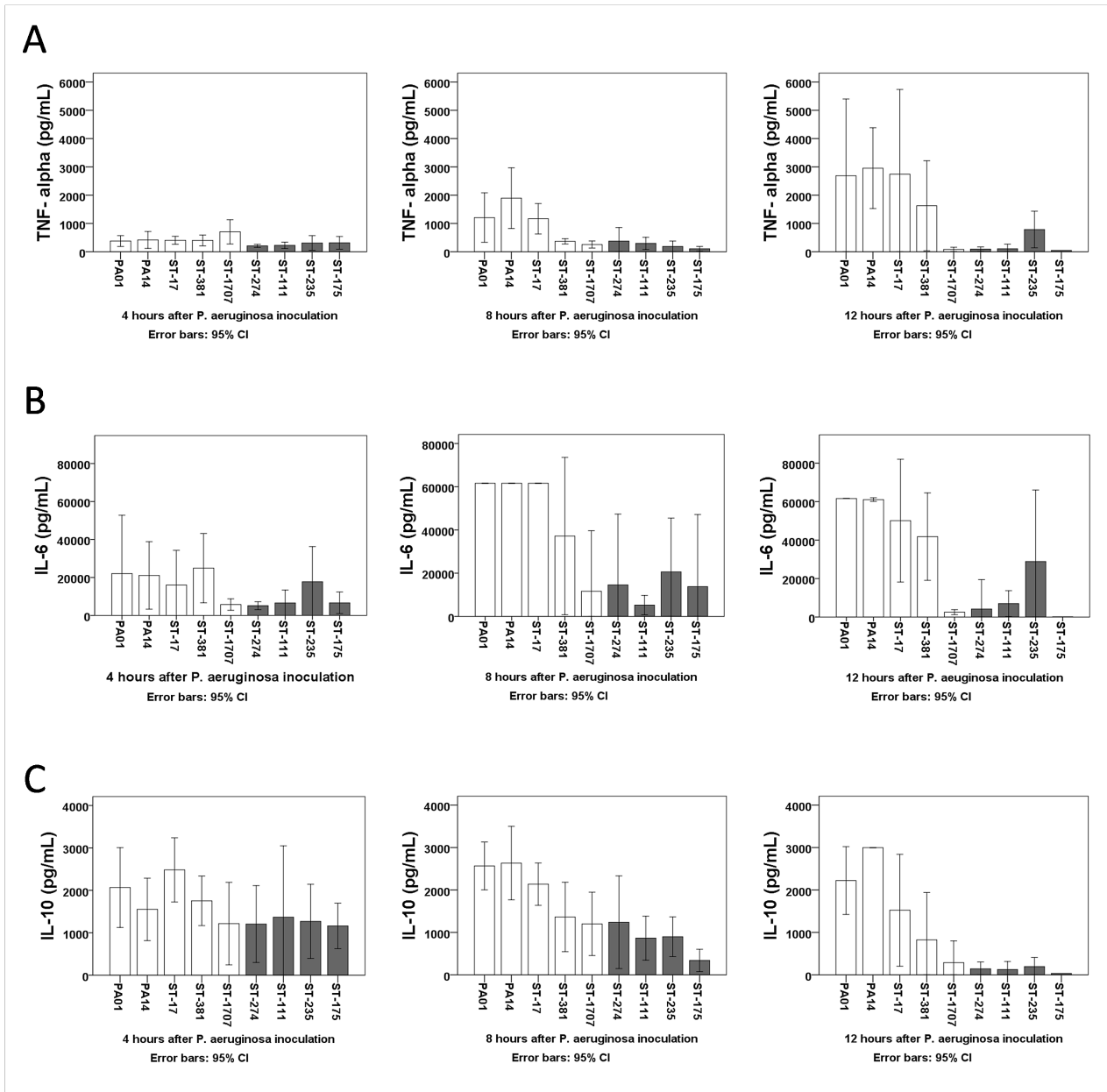


Figure 31. Time 0 represented the moment of the intraperitoneal inoculation of *P. aeruginosa* strains. White boxes, susceptible *P. aeruginosa* isolates. Black boxes, MDR/XDR *P. aeruginosa* isolates; 95% CI, 95% confidence interval. TNF- α levels (A) were higher at all time-points in clinical multiS strains than in MDR/XDR strains ($p=0.001$; $p=0.003$ and $p=0.004$ at 4h, 8h and 12h respectively). IL-6 levels (B) were higher in multiS clinical strains than in MDR/XDR strains at 8h ($p=0.036$) and 12h ($p=0.007$). No differences were observed at 4h ($p=0.139$); IL-10 levels (C) were higher at all time-points in multiS strains than in MDR/XDR strains ($p=0.014$; $p=0.001$ and $p<0.001$ at 4h, 8h and 12h respectively).

Table 18. Bacterial and leukocyte counts in peritoneal fluid and ability to produce bacteremia of the nine *P. aeruginosa* strains studied in the mouse peritonitis model.

Resistant profile of <i>P. aeruginosa</i>	Strain	4 hours			8 hours			12 hours		
		Bacterial count in PF (Log CFU/mL)*	Leukocyte count in PF (cellsx10 ⁶ /mL)*	Bacteremia (%)	Bacterial count in PF (Log CFU/mL)*	Leukocyte count in PF (cellsx10 ⁶ /mL)*	Bacteremia (%)	Bacterial count in PF (Log CFU/mL)*	Leukocyte count in PF (cellsx10 ⁶ /mL)*	Bacteremia (%)
MultiS	(1) PAO1	5.69(5.61-6.09)	3.12(2.38-5.20)	5(100)	7.10(6.88-7.23)	2.00(1.46-2.88)	5(100)	7.85(7.42-8.32)	0.88(0.46-1.92)	5(100)
	(2) PA14	6.18(5.76-6.32)	3.32(2.38-5.20)	5(100)	7.04(6.65-7.23)	2.20(2.16-3.70)	5(100)	8.43(8.20-8.62)	1.88(1.56-2.52)	5(100)
	(3) ST-17	5.71(4.37-5.80)	6.8(2.40-10.4)	5(100)	7.00(6.63-7.15)	4.60(3.48-7.48)	5(100)	7.97(7.50-8.27)	3.12(1.78-4.32)	5(100)
	(4) ST-381	5.00(4.42-5.15)	3.76(2.38-5.52)	5(100)	5.95(5.84-6.15)	4.24(2.12-8.72)	5(100)	7.92(7.16-8.06)	6.00(1.24-7.60)	5(100)
	(5) ST-1707	5.23(5.00-5.39)	3.28(3.08-3.44)	5(100)	3.90(3.21-5.23)	8.40(5.72-9.40)	4(80)	3.60(3.09-4.01)	1.68(0.94-4.44)	3(60)
MDR non-XDR	(6) ST-274	6.02(5.68-6.30)	1.68(1.38-3.22)	5(100)	4.43(4.12-5.49)	6.72(3.98-8.74)	5(100)	3.78(3.53-5.16)	5.04(3.12-11.56)	3(60)
	(7) ST-111	5.13(3.57-5.30)	1.36(1.04-2.92)	3(60)	5.32(4.20-6.18)	8.72(5.68-8.80)	5(100)	4.17(3.27-5.37)	11.60(9.00-12.80)	3(60)
MDR XDR	(8) ST-235	4.50(4.08-4.74)	2.60(2.12-2.82)	5(100)	5.32(3.90-5.53)	1.80(1.54-2.50)	5(100)	4.95(4.41-6.48)	3.08(2.92-3.16)	5(100)
	(9) ST-175	3.70(2.63-3.84)	2.88(2.30-9.14)	4(80)	3.07(1.87-3.33)	9.8(5.00-15.80)	5(100)	2.27(1.63-2.53)	5.4(0.46-6.60)	1(20)

Table 18. Abbreviations: MultiS, multisusceptible; MDR Multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant; PF, Peritoneal fluid; CFU, Colony Forming Units. * Data expressed as median (Interquartile Range).

DISCUSIÓN

1. Epidemiología de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1. Dinámica de colonización intestinal por *P. aeruginosa* en pacientes críticos.

La epidemiología de *P.aeruginosa* es compleja. La ampliación del conocimiento sobre las principales rutas de diseminación de cepas multirresistentes es fundamental para poder diseñar estrategias de control efectivas que eviten su diseminación. El tracto gastrointestinal es considerado como el principal reservorio endógeno de *P. aeruginosa*, por dicho motivo en el **artículo 1** intentamos profundizar en el estudio de la patogenia de la colonización intestinal por *P. aeruginosa*. En este estudio analizamos los cambios temporales de colonización intestinal por *P. aeruginosa* en una cohorte prospectiva de pacientes ingresados en la UCI y estudiamos la dinámica de colonización en función del patrón de resistencia antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa*. Ésta colonización resultó más precoz con las cepas de *P. aeruginosa* no multirresistentes que con las multirresistentes. Esto se puede explicar por el hecho de que la colonización por cepas multirresistentes necesita de una presión antibiótica previa al desarrollo de mutantes resistentes, y por lo tanto, cierto tiempo sometidos a presión antibiótica previo al desarrollo de la multirresistencia.

Cuando analizamos los pacientes con colonización inicial por *P. aeruginosa* no-MDR y posterior colonización con MDR observamos que en el 56% de los casos las cepas no-MDR y la posterior MDR eran idénticas en los estudios genotípicos. Esto sugiere que una cepa inicialmente sensible sometida a presión antibiótica acababa desarrollando mutaciones de resistencia hasta adquirir un perfil de multirresistencia. En el otro 44% la presión antibiótica condicionó una ventaja selectiva de crecimiento a las cepas multirresistentes, principalmente a los clones epidémicos de alto riesgo.

Los estudios genotípicos realizados en este trabajo demostraron la existencia de dos clusters en las cepas con fenotipo MDR, de forma que prácticamente la totalidad de las cepas con perfil de resistencia XDR estaban representadas con el clon de alto riesgo ST-175 y entre el fenotipo MDR no-XDR se observaron cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST-111. Estos clones epidémicos están más relacionados con una transmisión cruzada u horizontal. Por lo que probablemente, algunos de estos pacientes presentaran una colonización exógena con anterioridad a la colonización intestinal. Una de las principales limitaciones de este estudio es que únicamente se realizó vigilancia activa de colonización rectal por lo que otras vías de colonización más relacionadas con la transmisión cruzada o a partir de reservorios ambientales contaminados no fueron investigadas. Sin embargo, este estudio muestra la complejidad de la epidemiología de *P. aeruginosa* MDR en la que diferentes cepas no epidémicas y clusters epidémicos pueden coexistir. Además, describe la dinámica de colonización intestinal de los pacientes, sugiriendo que la colonización intestinal por cepas multirresistentes requiere una presión antibiótica previa y por lo tanto es más tardía que la colonización intestinal por cepas no multirresistentes.

1.2. Colonización intestinal como predictor del desarrollo de infección por *P. aeruginosa*.

Clásicamente se ha considerado que la colonización intestinal precede el desarrollo de la infección. Sin embargo, la importancia real de la colonización intestinal en la infección por *P. aeruginosa* no ha sido bien estudiada. Existen únicamente algunos estudios de carácter descriptivo que hayan evaluado el papel de la colonización en el desarrollo posterior de la infección [37, 167-168], pero su diseño metodológico no permite establecer relaciones concluyentes de causalidad. Así, en algunos de estos estudios el tamaño muestral es tan pequeño que dificulta el análisis estadístico [37, 167]. Por otro lado, la ausencia de cultivos seriados de vigilancia de colonización intestinal impide establecer relaciones temporales de causalidad en algunos de estos estudios [37, 168]. Por último, La falta de estudios genotípicos [37, 168] impide establecer relaciones causales definitivas el no poder confirmar la concordancia genotípica entre los aislamientos epidemiológicos de colonización y las muestras clínicas de infección.

Por este motivo, con el **artículo 2** nos planteamos realizar un estudio prospectivo de una cohorte de pacientes ingresados en una unidad de UCI con el objetivo de analizar la relación existente entre colonización e infección por *P. aeruginosa*. Para poder establecer una relación temporal entre colonización e infección, se realizó una vigilancia activa semanal del estado de colonización intestinal y un seguimiento prospectivo diario de los pacientes para detectar infección por *P. aeruginosa*. Por otro lado, se realizaron estudios moleculares de las cepas para poder establecer la relación genética entre los aislamientos epidemiológicos y las muestras clínicas.

Nuestro estudio demostró la existencia de una asociación significativa entre la colonización intestinal previa por *P. aeruginosa* y el desarrollo posterior de infección; tal y como lo muestra

el que el riesgo de desarrollar infección por *P. aeruginosa* fue 15 veces superior en pacientes colonizados que en no colonizados (HR, 15.23; 95% IC, 6.9-33,7; p<0.001). Por medio de estudios genotípicos se objetivó que existía una elevada concordancia (87%) entre los aislamientos epidemiológicos y los de las muestras clínicas. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la colonización intestinal por *P. aeruginosa* es un requerimiento clave para el desarrollo posterior de infección en pacientes ingresados en UCI.

El conocimiento del estado de colonización de los pacientes puede ayudar a decidir la cobertura antibiótica empírica en caso de infección. Así, si conocemos el perfil de resistencia que coloniza a los pacientes, se podría restringir el uso empírico de fármacos de última línea para aquellos colonizados por patógenos multirresistentes, evitando los efectos deletéreos que supondría una cobertura empírica universal con estos fármacos. En consonancia con nuestros resultados, en un estudio retrospectivo realizado en una UCI donde se realizaba de forma rutinaria vigilancia activa de colonización se demostró que el 75% de las bacteriemias estaban precedidas por colonización previa y que los pacientes con colonización previa recibían con más frecuencia un tratamiento empírico adecuado que aquellos no colonizados [38]. Igualmente, un estudio reciente de una cohorte retrospectiva también demostró que la colonización por *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos se asociaba estadísticamente con el desarrollo de posterior de infecciones por dicho patógeno [169].

En conclusión, con este estudio demostramos que la colonización intestinal por *P. aeruginosa* es un requerimiento clave para el desarrollo posterior de infección por *P. aeruginosa* en pacientes ingresados en la UCI. La vigilancia seriada de colonización intestinal y los estudios genotípicos realizados en nuestro trabajo avalan estos resultados.

1.3. Presión antibiótica como factor de riesgo fundamental para la colonización e infección por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes y extremadamente resistentes.

Diversos estudios han demostrado que la exposición a antibióticos es un factor de riesgo fundamental para el desarrollo de patógenos multirresistentes [32, 170-172]. Sin embargo, hasta hace pocos años la ausencia de definiciones internacionales consensuadas sobre la terminología de multirresistencia dificultaba la extrapolación de los resultados y la comparación de diferentes estudios [173]. Afortunadamente, en el 2012 se creó un documento internacional para definir de forma consensuada la multirresistencia, extremada resistencia y pan resistencia de los patógenos nosocomiales más frecuentes [147]. Nuestros estudios sobre el impacto del consumo previo de antibióticos en la colonización e infección por *P. aeruginosa* multirresistente y extremadamente resistente son los primeros de este tipo realizados siguiendo estas nuevas definiciones, lo que facilita la interpretación y generalización de nuestros resultados, así como su comparación con otras investigaciones.

En el **artículo 1** evaluamos el impacto de la presión antibiótica en el desarrollo de colonización intestinal por *P. aeruginosa* multirresistente, teniendo en cuenta la exposición en días a cada antibiótico. En el estudio no ajustado, el consumo previo de fluoroquinolonas y de carbapenémicos tanto de tipo 1 (ertapenem) como de tipo 2 (imipenem y meropenem) se relacionaron con la adquisición de colonización por *P. aeruginosa* multirresistente. Mediante un análisis de Cox ajustado encontramos que los únicos factores de riesgo que se asociaban de forma independiente al desarrollo de colonización por *P. aeruginosa* multirresistente fueron el consumo previo de fluoroquinolonas (aHR 1.02; IC 95% 1.00-1.04; p=0.039) y de carbapenémicos del grupo 1 (aHR 1.08; IC 95% 1.02-1.14; p=0.004). Es ampliamente conocido que la exposición a carbapenémicos [32, 174] y a fluoroquinolonas [32, 171, 174-177] se asocia a la colonización por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes. Sin embargo, el impacto del consumo previo de ertapenem en la selección de cepas resistentes es más controvertido.

P. aeruginosa posee resistencia inherente al ertapenem, por lo que el uso de este fármaco en lugar de otros carbapenémicos podría retrasar el desarrollo de resistencias a carbapenémicos en *P. aeruginosa*. Sin embargo, existe una preocupación generalizada en la literatura sobre si la exposición a ertapenem podría comprometer la susceptibilidad de *P. aeruginosa* a los carbapenémicos con actividad antipseudomónica. Diversos estudios han investigado el posible impacto del ertapenem en el desarrollo de resistencias en *P. aeruginosa*. Estudios experimentales han demostrado que este fármaco puede seleccionar *in vitro* resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*, pero no queda claro que estos mecanismos tengan relevancia *in vivo* [178-179]. En cuanto a estudios clínicos, algunos estudios epidemiológicos sugieren que el uso de ertapenem no se asocia a un aumento de la resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*, pero son estudios basados en análisis ecológicos que tienen como unidad de estudio la población y que por lo tanto impiden obtener conclusiones concluyentes [180-181]. Otros estudios clínicos investigaron el impacto de la introducción de ertapenem en el medio hospitalario en la resistencia a carbapenémicos encontrando una asociación inversa entre el ertapenem y la aparición de resistencias a carbapenémicos del grupo 2. Sin embargo, esta disminución de resistencias a carbapenémicos parecía estar relacionada con el menor consumo de fluoroquinolonas tras la introducción del ertapenem más que por el ertapenem en sí mismo [182-183]. Nuestros resultados, por el contrario, apoyan que el consumo de ertapenem puede aumentar el riesgo de desarrollar colonización por *P. aeruginosa* multirresistente. En consonancia con nuestros resultados un estudio de casos-control realizado por Cohen et al. [184] en el que se analizaron 800 casos de infección por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y su correspondiente control, encontraron una asociación significativa entre el consumo de ertapenem y la aparición de resistencias a carbapenémicos en *P. aeruginosa*. La selección de cepas resistentes por el ertapenem podría explicarse porque al eliminar la flora gastrointestinal habitual del paciente este fármaco favorecería la selección y crecimiento de cepas de *P. aeruginosa* multirresistente. Otra posible

explicación sería que el uso prolongado de ertapenem pudiera promover el desarrollo de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*.

En el **artículo 3** estudió el papel de la antibioticoterapia para el desarrollo de bacteriemias por *P. aeruginosa* XDR, identificándose el consumo previo de fluoroquinolonas como factor de riesgo específico para el desarrollo de este tipo de infecciones. De hecho, en el análisis ajustado de regresión logística la exposición previa a fluoroquinolonas fue el único factor de riesgo independiente asociado al desarrollo de bacteriemia por *P. aeruginosa* XDR (OR 2.80; 95% IC 1.02-7.70). Las fluoroquinolonas son sustrato universal de las bombas de expulsión activa presentes en la pared celular de *P. aeruginosa* [185]. Estas bombas son capaces de eliminar a la vez varias familias de antibióticos, lo que explica que la exposición a quinolonas pueda favorecer el desarrollo de multirresistencia en *P. aeruginosa* [171, 175-177, 186].

En este mismo trabajo al comparar las bacteriemias por *P. aeruginosa* no-MDR con aquellas producidas por cepas MDR no-XDR comprobamos que las segundas se asociaban de forma claramente significativa a los días de antibioticoterapia previa recibida. Así, todas las bacteriemias causadas por cepas MDR no-XDR habían presentado consumo previo de antibióticos. La emergencia de patógenos resistentes tras el consumo previo prolongado de antibioticoterapia está ampliamente descrito en la literatura previa [170-172, 187].

2. Impacto de la resistencia antibiótica en la patogenicidad de *P. aeruginosa*.

El impacto de la resistencia antimicrobiana en el pronóstico de los pacientes sigue siendo un tema controvertido. A pesar de que algunos estudios sugieren que los pacientes con infecciones multirresistentes se asocian a un peor pronóstico, ello podría estar condicionado por diferencias en las características basales de los pacientes y por un retraso del tratamiento adecuado, y no por una mayor virulencia de las cepas resistentes. Diversos estudios sugieren la posible existencia de un coste biológico asociado a la resistencia antibiótica que podría comportar una menor virulencia de las bacterias multirresistentes. La influencia de la resistencia en la patogenicidad de *P. aeruginosa* es de gran importancia, entre otras cosas porque sería útil para guiar las políticas antibióticas de nuestros centros.

En base a la hipótesis inicial de trabajo, nos planteamos una serie de estudios clínicos y experimentales para abordar este problema globalmente y profundizar en la cuestión del impacto real de la multirresistencia en la infección por *P. aeruginosa*. En un ámbito experimental, estudiamos *in vitro* las posibles diferencias en la expresión de los principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* entre cepas sensibles y resistentes; y mediante un modelo experimental animal el impacto de la multirresistencia en la capacidad de producir infección, respuesta inflamatoria y mortalidad. Desde un punto de vista clínico, analizamos cómo afectaba la multirresistencia la capacidad de producir infección (invasividad clínica), la capacidad de producir respuesta inflamatoria una vez producida la infección y el pronóstico de los pacientes. En las siguientes páginas, discutiremos los resultados de todos estos estudios, comparándolos entre sí y con la literatura científica existente al respecto.

2.1. Multirresistencia y coste biológico en *P. aeruginosa*: estudios experimentales.

El efecto de las mutaciones de resistencia en el fitness bacteriano de *P. aeruginosa* no está bien establecido. Se cree que los cambios genotípicos y fenotípicos que confieren resistencia también condicionan una reducción del fitness bacteriano que conlleva una menor tasa de crecimiento, una menor transmisibilidad, una menor invasividad y/o una menor virulencia que las cepas sensibles [23, 75-76]. Este coste biológico es debido a que los antibióticos toman como dianas funciones o estructuras básicas para las bacterias como son la síntesis de la pared celular, síntesis de proteínas o la transcripción de material genético [24, 188]; por lo que la modificación de estas dianas por las mutaciones de resistencia se acompaña de un coste biológico para la bacteria. Sin embargo, diversos autores apoyan que las bacterias resistentes pueden evolucionar y adaptarse para aminorar este coste asociado a la resistencia [23-25, 76-79, 81, 90]. Así, se ha sugerido que las bacterias son capaces de desarrollar mutaciones secundarias compensatorias para recuperar la eficacia de la función alterada por la mutación de resistencia o para sustituir dicha función por una vía alternativa, con lo que restauran el fitness bacteriano inicial [24, 80-81]. De esta forma, la bacteria conseguiría mantener la resistencia antibiótica sin que esto se asociara a un coste biológico.

Con nuestros **trabajos 7 y 8** intentamos dilucidar este controvertido asunto mediante estudios experimentales *in vitro* y mediante un modelo animal de peritonitis sepsis en ratón. En un modelo animal objetivamos que los ratones inoculados por cepas sensibles presentaron una mayor mortalidad y que ésta fue más precoz que la que se produjo en ratones inoculados por cepas multirresistentes. Además, las concentraciones bacterianas en líquido peritoneal fueron mayores en ratones inoculados por cepas sensibles que en aquellos inoculados por cepas multirresistentes. Todos estos datos sugieren que la adquisición de resistencia antimicrobiana por parte de *P. aeruginosa* se asocia a una reducción de la patogenicidad en un modelo animal. Nuestros resultados son semejantes a los de estudios experimentales previos que también

observaron que la supervivencia era mayor en animales inoculados con cepas resistentes, apoyando la hipótesis de que la resistencia se asocia a un coste biológico [71, 85-87].

En el modelo experimental *in vitro* analizamos una serie de determinantes microbiológicos que consideramos podían estar relacionados con la patogenicidad de *P. aeruginosa* y comparamos la expresión de dichos determinantes en las diferentes cepas de *P. aeruginosa*. La evaluación del coste biológico mediante estudios *in vitro* típicamente se objetiva en una reducción de las tasas de crecimiento de las cepas resistentes [23-24, 76] por lo que en nuestro trabajo incluimos estudios de crecimiento *in vitro*. En ellos observamos que las cepas clínicas sensibles presentaron un tiempo de duplicación bacteriana más corto que el de las cepas clínicas MDR/XDR (0.42 ± 0.08 vs. 0.55 ± 0.14 ; $p=0.023$). En consonancia con nuestros resultados, una serie de estudios previos también han demostrado que la resistencia antibiótica se asocia a una reducción de las tasas de crecimiento *in vitro* [71, 75, 88-89]. Igualmente, estudios de crecimiento competitivo *in vitro* [62, 71, 89] e *in vivo* [71] también demostraron que los índices de competitividad fueron significativamente inferiores en las cepas resistentes que en las sensibles. Estos datos indicarían que la capacidad de crecimiento y multiplicación bacteriana está comprometida por el desarrollo de resistencias antibióticas.

Sin embargo, en el resto de los parámetros biológicos estudiados (citotoxicidad, invasividad y genotipo SSTT) no encontramos diferencias significativas entre las cepas sensibles y resistentes. Esto sugiere que la mayor patogenicidad *in vivo* de las cepas sensibles debe ser debida a otros determinantes biológicos que no fueron evaluados en nuestro estudio. En este sentido, estudios recientes han analizado otros determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* que podrían explicar la diferente supervivencia que encontramos en el modelo animal entre cepas sensibles y resistentes. Así, en el estudio realizado por Sun Z. et al. [89] se evaluaron 11 parejas de cepas clínicas isogénicas de *P. aeruginosa* en el que se comparaba una cepa sensible

inicial y cepa resistente aislada posteriormente tras haber estado el paciente expuesto a presión antibiótica. En este estudio observaron que las cepas sensibles presentaron unas tasas de crecimiento superiores que las resistentes y mediante estudios de competitividad bacteriana *in vitro* también demostraron una disminución del fitness bacteriano tras la aparición de resistencias. Además, los autores evaluaron una serie de factores que favorecen la invasividad bacteriana, como la producción de matriz extracelular, la actividad de proteasas o elastasas, encontrando que todos estaban disminuidos en las cepas resistentes. Otros estudios también han demostrado que las cepas resistentes son deficitarias en la expresión de otros determinantes de virulencia como el presentar una menor motilidad bacteriana [51], una menor producción de pigmentos [51, 88], una menor capacidad de producir matriz extracelular y una menor actividad de las elastasas, las proteasas y la fosfolipasa C [88]. Sin embargo, varios estudios coinciden que la producción de biofilm, que favorece la persistencia de la bacteria a largo plazo, es superior en las cepas resistentes [89, 51].

Por otro lado, nuestro estudio demostró que la patogenicidad de *P. aeruginosa* puede variar entre cepas con un perfil de resistencia semejante. Así, de las cinco cepas sensibles estudiadas observamos que una, la cepa ST-1707, presentaba un comportamiento menos virulento que las restantes, mientras que una de las cuatro cepas multirresistentes estudiadas, la ST-235, fue más virulenta y su comportamiento se parecía más al de las cepas sensibles. Otros estudios experimentales también sugieren que aunque por norma general las cepas resistentes presentan una menor invasividad y mortalidad, algunas cepas mantienen la misma virulencia que las cepas sensibles [71, 189]. Otros autores apoyan que determinados mecanismos de resistencia, como la pérdida de porina OprD, podrían asociarse a un mayor fitness bacteriano [91].

Los resultados del **trabajo 7** sugieren que la adquisición de resistencias por parte de *P. aeruginosa* se asocia de una menor patogenicidad. Pero también pone de manifiesto la complejidad que supone el estudio de la relación entre la resistencia antibiótica, el fitness bacteriano y la virulencia. El estudio del impacto de la resistencia antibiótica en la patogenicidad de la bacteria es complicado, ya que la infección es un proceso complejo en el que intervienen otros factores diferentes de los microbiológicos, como son la interacción huésped-patógeno. Por este motivo realizamos el **trabajo 8** para investigar cómo ocurre la respuesta inflamatoria en la infección por *P. aeruginosa* en un modelo animal y comparar la interacción huésped-bacteria entre cepas sensibles y MDR.

Durante la sepsis se produce una liberación de interleuquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias y se ha demostrado que la intensidad de dicha respuesta inflamatoria se asocia con el pronóstico de la infección [115-117]; por lo que en un modelo de peritonitis sepsis en ratón estudiamos las principales citoquinas pro-inflamatorias (TNF e IL-6) y antiinflamatorias (IL-10) tras la inoculación de nueve cepas de *P. aeruginosa* con diferente patrón de resistencia. En nuestro estudio observamos que las concentraciones de interleuquinas fueron muy superiores en las cepas sensibles que en las resistentes. Estos resultados son acordes con los pocos trabajos existentes que investigan la relación entre el patrón de resistencia antibiótica de *P. aeruginosa* y su capacidad de producir respuesta inflamatoria [85, 87].

A pesar de que en general las cepas sensibles provocaron una mayor respuesta inflamatoria que las cepas resistentes, este estudio puso de manifiesto que cepas con fenotipos semejantes pueden provocar patrones de respuesta inflamatoria diferentes. La cepa ST-235 presentó un patrón de respuesta inflamatoria parecido al que presentaban las cepas sensibles, aunque los niveles de interleuquinas fueron inferiores a los causados por infecciones sensibles. De forma similar a los resultados en patogenicidad, una de las cepas sensibles (ST-1707)

produjo una respuesta inflamatoria muy inferior al resto de las sensibles estudiadas. Estos hallazgos sugieren que las diferencias en la respuesta inflamatoria dependen no exclusivamente del perfil de resistencia, sino de diferentes variables que intervienen en la interacción de la bacteria con el sistema inmune y confirman la compleja interacción huésped-patógeno que se produce en la infección y la dificultad inherente de tener este tipo de estudios.

2.2. Impacto clínico de la multirresistencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2.a. Diferencias en la capacidad de producir infección clínica de *P. aeruginosa* sensible y resistente.

Mediante dos estudios, uno retrospectivo y uno prospectivo, evaluamos las diferencias en la patogenicidad de *P. aeruginosa* sensible y resistente, determinando su capacidad de producir infección en pacientes previamente colonizados. En el estudio retrospectivo, **artículo 3**, se analizó la capacidad de producir bacteriemia en pacientes con muestras clínicas de colonización o infección por *P. aeruginosa*. En este trabajo se incluyeron más de dos mil pacientes con muestra clínicas de *P. aeruginosa* y se calculó la capacidad de producir bacteriemias como la proporción de bacteriemias entre los pacientes infectados o colonizados por un determinado perfil de resistencia.

Las principales limitaciones de este estudio fueron su carácter retrospectivo, la ausencia de vigilancia activa de colonización y la falta de estudios genotípicos. A pesar de estas limitaciones, observamos que la proporción de bacteriemias fue superior en el grupo de *P. aeruginosa* XDR (16%) que en aquellos colonizados por *P. aeruginosa* no-MDR y MDR no-XDR (ambos con un 6%). La mayor proporción de bacteriemias en el grupo de *P. aeruginosa* XDR probablemente estuvo en relación con la naturaleza epidémica de estas cepas, más que por la propia multirresistencia. De hecho, las cepas de *P. aeruginosa* MDR no-XDR de naturaleza policlonal, a pesar de acumular un elevado número de mutaciones de resistencia, no presentaron una invasividad superior a las cepas no-MDR. Por lo tanto, probablemente características específicas de los linajes epidémicos de *P. aeruginosa* XDR son los responsables de la mayor invasividad observada en este estudio, más que la propia multirresistencia.

Para solventar las limitaciones de este primer estudio retrospectivo, se diseñó un estudio prospectivo, **artículo 2**, con vigilancia activa de colonización intestinal e infección por *P.*

aeruginosa y con estudios genotípicos de las cepas. En este estudio se analizó si la adquisición de resistencias influía en la capacidad invasiva de *P. aeruginosa*, objetivándose que la infección era más precoz en pacientes colonizados por *P. aeruginosa* no-MDR y XDR que en aquellos con *P. aeruginosa* MDR no-XDR como se observa en las **figuras 25** (pág.130).

Los estudios genotípicos demostraron la naturaleza epidémica de las cepas de *P. aeruginosa* XDR, representadas en la globalidad por clones epidémicos de alto riesgo, fundamentalmente el clon ST-175. Dado que la naturaleza epidémica de estos clones XDR sugerían unas características específicas y una mayor asociación a la transmisión cruzada por una mayor adhesividad; analizamos si existían diferencias en los focos de infección. Observamos que las infecciones relacionadas con catéteres vasculares y urinarios fueron significativamente más frecuentes en las cepas de *P. aeruginosa* XDR que en los otros fenotipos. Estos focos, asociados a la manipulación y colocación de dispositivos, están asociados con la transmisión cruzada, apoyando por lo tanto nuestros resultados que estos linajes de *P. aeruginosa* XDR se asocian de forma característica a la transmisión cruzada u horizontal.

Debido a que los clones epidémicos de *P. aeruginosa* XDR se asocian con rutas de infección exógenas, en estos pacientes la colonización rectal podría ocurrir con posterioridad a la infección. Por lo tanto, se realizó un subanálisis en el que se incluyeron únicamente los aislamientos policlonales, es decir, los de *P. aeruginosa* no-MDR y MDR no-XDR. En este análisis encontramos que los pacientes colonizados por cepas no-MDR presentaron un mayor riesgo de infección que aquellos colonizados por cepas MDR, tal y como se muestra en la **figura 25.b** (página 130). Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas sí que se observó una tendencia a la significación estadística ($p= 0.10$), que se mantuvo al ajustar por posibles factores de confusión en el análisis multivariante. La principal limitación de este estudio fue el pequeño tamaño muestral al realizar los subgrupos por fenotipos, que

probablemente fue la causa de que las diferencias no alcanzaran la significación estadística. A pesar de estas limitaciones nuestro trabajo sugiere que las cepas de *P. aeruginosa* no-MDR presentan una mayor capacidad invasiva clínica que las cepas MDR no clonales, entendida como una mayor capacidad de producir infección en pacientes previamente colonizados.

En resumen, mediante dos estudios clínicos se analizó si existían diferencias en la capacidad de producir infección en función del perfil de resistencia de *P. aeruginosa*. En ambos estudios observamos una mayor capacidad invasiva clínica en las cepas de *P. aeruginosa* XDR, debida fundamentalmente a que este fenotipo incluía clones epidémicos que podían explicar una mayor invasividad, en relación a medidas inadecuadas en la manipulación, más que a la multirresistencia en sí misma. Sin embargo, al excluir las cepas epidémicas, observamos que las no-multirresistentes presentaban una mayor capacidad invasiva clínica que las cepas multirresistentes. Esto apoyaría la hipótesis inicial de la existencia de un coste biológico asociado a la resistencia, que justificaría una menor capacidad de *P. aeruginosa* MDR de producir infección en pacientes previamente colonizados. En cualquier caso, es necesario la realización de nuevos estudios prospectivos con mayor tamaño muestral para confirmar la relación entre la resistencia antimicrobiana y la virulencia en el ámbito clínico.

2.2.b. Capacidad de *P. aeruginosa* de producir respuesta inflamatoria en función del perfil de resistencia antibiótica .

En el **trabajo 4** evaluamos si existía relación entre el patrón de respuesta inflamatoria y el perfil fenotípico de *P. aeruginosa*. Curiosamente y en contraposición a lo que observamos en el trabajo 8 que evaluaba la respuesta inflamatoria en un modelo animal, observamos que las cepas de *P. aeruginosa* XDR presentaron una mayor respuesta inflamatoria que los otros fenotipos. Sin embargo, estos resultados han de ser tomados con cautela, ya que pueden explicarse por causas relacionadas con el diseño del estudio. Así, en el trabajo 4 el porcentaje de episodios con bacteriemia fue superior en el grupo de infecciones por *P. aeruginosa* XDR que en los otros fenotipos. En el mismo trabajo demostramos que las infecciones bacteriémicas presentaban una mayor respuesta inflamatoria que las no bacteriémicas (**tabla 12, página 134**) por lo que la mayor respuesta inflamatoria encontrada en las infecciones por *P. aeruginosa* XDR podría ser debida en parte, al mayor porcentaje de bacteriemias en este grupo. De hecho, a pesar de que la respuesta inflamatoria fue superior en las infecciones XDR esto no se acompañó de una mayor mortalidad, sino que por el contrario las cepas no-MDR presentaron una mayor mortalidad, aunque las diferencias no llegaron a alcanzar la significación estadística (16% para no-MDR vs. 8% para XDR, $p=0.40$). Por este motivo, realizamos un análisis estratificado en función del tipo de infección y en dicho estudio, observamos que al analizar exclusivamente las infecciones bacteriémicas no había diferencias significativas en la respuesta inflamatoria entre los diferentes fenotipos de *P. aeruginosa*. Es más, los niveles de biomarcadores inflamatorios fueron superiores en las bacteriemias causadas por *P. aeruginosa* no-MDR que en las causadas por cepas MDR no-XDR y cepas XDR (**tabla 10, página 133**), aunque sin alcanzar la significación estadística. A pesar de lo anterior, no podemos descartar que algunos determinantes biológicos asociados con los clones epidémicos de alto riesgo y su diferentes vías de transmisión pudieran explicar las diferencias encontradas en la respuesta inflamatoria clínica.

Durante el desarrollo del estudio clínico nos encontramos con una serie de limitaciones que dificultaron su realización y que podrían ayudar también a explicar la discordancia entre los resultados del estudio clínico y experimental. Una de las principales limitaciones fue el bajo número de episodios de infección que se pudieron incluir en el estudio. En segundo lugar, a la hora de obtener la muestra de plasma para el análisis de las citoquinas en un estudio clínico fue difícil asegurar que en todos los pacientes esta muestra se tomara en el mismo momento temporal de la infección. Por último, al tratarse de un estudio realizado en pacientes críticos muchos estaban recibiendo tratamientos corticoideos o antibioticoterapias en el momento de desarrollo de la infección y dichos tratamientos pudieron modificar los niveles de citoquinas circulantes. Además, es sabido que el patrón de respuesta inflamatoria depende enormemente la situación del sistema inmune del paciente y por lo tanto es diferente en función de la edad y comorbilidad de los pacientes [116]. Todas estas limitaciones apoyaron la necesidad de realizar un modelo experimental animal para evaluar la respuesta inflamatoria a la infección. Así, mediante un modelo animal se podría aumentar el tamaño de la muestra, estandarizar los puntos horarios en los que se realizaba la extracción sanguínea para la determinación de las interleuquinas y utilizar una muestra homogénea (ratones inmunocompetentes, de la misma edad y no sometidos previamente a ningún tratamiento que pudiera modificar la respuesta inflamatoria obtenida).

2.2.c. Impacto de la resistencia antibiótica en el pronóstico del paciente.

La relación entre la resistencia antimicrobiana y el impacto en el pronóstico de los pacientes es un tema de elevado interés. A pesar del aumento de la prevalencia de infecciones multirresistentes en las últimas décadas, todavía no se ha elucidado si éstas se asocian a un peor pronóstico. Generalmente las infecciones multirresistentes se asocian a pacientes con ingresos previos más prolongados y una mayor severidad de las enfermedades subyacentes, pudiendo estos factores condicionar un peor pronóstico de los pacientes, más que la propia virulencia del patógeno. De hecho, frecuentemente la impresión clínica es que las infecciones causadas por *P.aeruginosa* multirresistente se comportan inicialmente de una forma más indolente que las producidas por cepas sensibles.

Existe abundante literatura que aborda el tema del impacto de la resistencia en el pronóstico de los pacientes, con resultados muy dispares. Uno de los primeros estudios que intentó cuantificar el impacto clínico y económico de la resistencia en *P. aeruginosa* fue el realizado por Camerli et al [95] en el que los autores no encontraron diferencias ni en la mortalidad ni en la estancia hospitalaria entre infecciones por *P. aeruginosa* sensibles y resistentes al ingreso, aunque sí las objetivaron al comparar únicamente las infecciones que se habían adquirido durante el ingreso hospitalario sugiriendo una mayor gravedad de las infecciones resistentes; pero sin incluir ninguna investigación causal para explicar sus resultados. Estudios posteriores también han documentado una mayor mortalidad en pacientes con infección por *P. aeruginosa* multirresistente [97, 102, 108-110]. Sin embargo, el carácter retrospectivo de algunos de estos estudios, así como posibles sesgos al no ajustar por severidad de enfermedades subyacentes o adecuación del tratamiento inicial, hacen que sus resultados no sean concluyentes [102, 108, 110]. De hecho en el estudio de Depuydt et al. [102] que analiza el impacto de la multirresistencia en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica encuentran una mayor mortalidad en aquellas neumonías producidas por gérmenes

multirresistentes; pero al ajustar por posibles factores de confusión, la multirresistencia no se asocia a la mortalidad y ésta se explica por una mayor comorbilidad. Dos estudios encontraron una mayor mortalidad en las infecciones por *P. aeruginosa* multirresistente incluso tras ajustar por posibles factores de confusión [97, 109]; pero estos estudios estaban limitados por su carácter retrospectivo y porque analizaron la mortalidad global o cruda, incluyendo además causas diferentes a la infección. En este sentido, un estudio de una cohorte prospectiva multicéntrica [106] de bacteriemias por *P. aeruginosa* mostró que la mortalidad precoz (primeras 48 horas de la infección) era superior en las bacteriemias causadas por cepas sensibles que en las resistentes a carbapenémicos. Esta mortalidad precoz refleja de una forma más precisa la mortalidad atribuible a la infección, siendo por lo tanto más útil para valorar el impacto que puede tener la multirresistencia en el pronóstico de los pacientes. De hecho, en esta misma cohorte la mortalidad global o tardía (a los treinta días) era superior en las bacteriemias por *P. aeruginosa* resistente, pero fue debida a la mayor gravedad de la situación de base y de las enfermedades subyacentes sin estar directamente relacionada con la infección.

Varios estudios sugieren que la resistencia antimicrobiana no se acompaña de una mayor mortalidad. Así en un estudio retrospectivo en el que se incluyeron más de 190 bacteriemias por *P. aeruginosa*, la resistencia antimicrobiana no fue identificado como factor de riesgo independiente para mortalidad [96]; como tampoco lo fue en un estudio de bacteriemias por bacilos gram negativos, que incluía *P. aeruginosa* [38]. Otros estudios encontraron que la resistencia se asocia a una mayor estancia hospitalaria, pero sin suponer una mayor mortalidad [105, 107]; y en una cohorte prospectiva a en la que participaron UCIs de diferentes países europeos, no se encontraron diferencias ni en la mortalidad ni en la estancia media en UCI al comparar las infecciones por *P. aeruginosa* resistente y sensible [103].

En consonancia con estos últimos estudios, en el **artículo 6** que evaluaba una cohorte prospectiva de bacteriemias por *P. aeruginosa* objetivamos que a pesar de que la mortalidad tardía era superior en los pacientes con infecciones multirresistentes, al analizar la mortalidad atribuible (cinco primeros días) no se encontraron diferencias significativas entre las infecciones por cepas multirresistentes y no multirresistentes.

Sin que fuera el objetivo principal del estudio, en el **artículo 4**, observamos que la mortalidad precoz era superior en pacientes con infecciones por *P. aeruginosa* no multirresistente (16%) que en las infecciones por *P. aeruginosa* multirresistente (10% y 8% para MDR no-XDR y XDR, respectivamente) aunque las diferencias no llegaron a alcanzar la significación estadística. Estos resultados, apoyarían también el que las infecciones multirresistentes no se acompañan de un peor pronóstico.

Por último, en el **artículo 5** analizamos el impacto de la multirresistencia en las neumonías por *P. aeruginosa* asociadas a la ventilación mecánica y observamos que las neumonías causadas por cepas multirresistentes se acompañaban de una mayor duración de la ventilación mecánica, una mayor estancia en UCI, una mayor comorbilidad de los pacientes y a un retraso en recibir el tratamiento antibiótico adecuado. Sin embargo, no se asociaron ni a una mayor mortalidad precoz ni tardía. De hecho, en este estudio observamos que la mortalidad precoz fue superior en los pacientes con neumonía causada por *P. aeruginosa* no multirresistente que en aquellos provocada por *P. aeruginosa* multirresistente (29% vs. 15%; $p=0.006$) y esto fue así a pesar de que las primeras recibieron un tratamiento adecuado con mayor frecuencia que las causadas por cepas multirresistentes (68% vs. 30%; $p<0.001$ en el caso del tratamiento empírico y 96% vs. 50%; $p<0.001$ cuando nos referimos a tratamiento definitivo).

Nuestros datos son acordes con los obtenidos por estudios recientes sobre neumonías asociadas a la ventilación mecánica, que encontraron que las causadas por gérmenes multirresistentes se asociaron a una mayor estancia en UCI y a una mayor necesidad de ventilación mecánica pero sin acompañarse de una mayor mortalidad [104-105, 190]. Tres estudios observacionales independientes que analizaron el impacto de la multirresistencia en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica por *P. aeruginosa* también concluyeron que las causadas por cepas multirresistentes no presentaron mayor mortalidad [29, 105]. Finalmente, en un trabajo realizado por Klevens et al. [93], los autores objetivaron que a pesar de que en las últimas décadas ha habido un aumento de las neumonías causadas por *P. aeruginosa* resistente, las tasas de mortalidad no habían aumentado con respecto a la década de los noventa en la que las tasas de resistencia de *P. aeruginosa* eran menores lo que también apoyaría que la resistencia antimicrobiana no se implica un peor pronóstico.

Nuestro trabajo sobre el impacto de la multirresistencia en el pronóstico de las neumonías asociadas a la ventilación mecánica está realizado en la UCI de nuestro hospital, donde la prevalencia de multirresistencia en *P. aeruginosa* es muy elevada. A pesar de ello, la política antibiótica de nuestro centro no incluye el uso de polimixinas endovenosas como tratamiento empírico generalizado. No obstante, esto no empeoró el pronóstico de los pacientes con infección por *P. aeruginosa* multirresistente. Esto sugiere que las políticas antibióticas empíricas restrictivas no se acompañan de una peor evolución de los pacientes, pudiéndose reservar los fármacos de última línea para el tratamiento dirigido, una vez que se conocen los resultados de los cultivos, con lo que evitaríamos toxicidades innecesarias a los pacientes y el desarrollo de resistencias a las pocas opciones terapéuticas disponibles.

3. *P. aeruginosa* high-risk clones: Epidemiología y comportamiento de los principales clones epidémicos de *P. aeruginosa* multirresistente.

Diversos estudios han demostrado recientemente la existencia de una serie de clones de *P. aeruginosa* distribuidos a nivel mundial, que se han denominado clones epidémicos de alto riesgo o high-risk clones [60, 66]. Estos clones presentan unas características biológicas peculiares que favorecen su gran adhesividad y transmisibilidad confiriéndoles un éxito biológico. Además, los high-risk clones se caracterizan por presentar una capacidad excepcional de adquirir mutaciones de resistencia por transferencia genética horizontal, lo que explica que expresen fenotipos de multirresistencia y extremada resistencia [9]. De hecho, la mayoría de las infecciones por *P. aeruginosa* multirresistentes a nivel mundial, especialmente aquellas con perfil de extremada resistencia; son debidas a estos pocos clones epidémicos de alto riesgo [9, 65-66].

El descubrimiento de la existencia de estos high-risk clones supone un cambio en el conocimiento que teníamos hasta ahora sobre la epidemiología de *P. aeruginosa*. Así, si clásicamente se consideraba que las infecciones por *P. aeruginosa* seguían fundamentalmente un patrón policlonal de origen endógeno [31]; la existencia de estos clones epidémicos pone en manifiesto la importancia de la ruta exógena como vía de transmisión ya que estos clones están fundamentalmente relacionados con la transmisión horizontal de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario o con la transmisión a partir de reservorios ambientales contaminados.

La amplia diseminación de estos high-risk clones, su difícil erradicación y su perfil de multirresistencia hace imprescindible que se desarrollen estudios para investigar su epidemiología, su comportamiento y los determinantes microbiológicos que favorecen su éxito biológico.

3.1. Epidemiología de los high-risk clones de *P. aeruginosa* en nuestro medio.

En cuanto a la epidemiología, gracias a la realización de los **trabajos 1-3 y 6** pudimos profundizar sobre la situación de estos clones epidémicos de alto riesgo en nuestro medio, mediante la realización de dos estudios en el Hospital Universitari de Bellvitge y un estudio multicéntrico.

Debido al aumento de la prevalencia de *P. aeruginosa* multirresistente que se objetivó en nuestro hospital a partir del 2002, en los años posteriores se llevo a cabo un programa de vigilancia en el que mediante una revisión diaria de los datos del laboratorio de microbiología se identificaban todos los pacientes con muestras de *P. aeruginosa* multirresistente. Los datos de este programa de vigilancia recogidos durante los años 2006 y 2007 fueron utilizados para la realización del **artículo 3**. Mediante técnicas de PFGE se puso de manifiesto que durante este periodo en los aislamientos de *P. aeruginosa* con perfil XDR predominaban dos clones epidémicos. Estos clústers fueron identificados mediante técnicas de MLST con los clones epidémicos de alto riesgo ST-111 y ST-175, siendo el ST-175 el mayoritario y el responsable de la mayoría de las infecciones por *P.aeruginosa* XDR de nuestro hospital.

Posteriormente, en el **trabajo 1** nos planteamos la realización de una vigilancia activa seriada de colonización intestinal en una cohorte de pacientes de UCI para obtener una aproximación más real de la situación epidemiológica y evaluar el protagonismo de estos clones en nuestro medio. Los datos moleculares nos alertaron sobre la existencia de diferentes clones multirresistentes de alto riesgo coexistiendo en nuestro hospital. En este trabajo se realizaron estudios de PFGE y MLST a todos los aislamientos rectales con *P. aeruginosa* MDR (83): 37 con cepas con perfil MDR no-XDR y 46 con cepas con perfil XDR. Entre los 37 aislamientos con *P. aeruginosa* MDR no-XDR los estudios moleculares demostraron que 19 correspondían al clon epidémico ST-111. Mientras que al analizar los 46 aislamientos con perfil XDR se objetivó que

todos pertenecían al mismo clon epidémico, identificado mediante MLST con el clon ST-175. Por lo tanto, más del 50% de los pacientes colonizados por *P.aeruginosa* MDR no-XDR y el total de los pacientes colonizados por *P. aeruginosa* XDR pertenecieron a clones epidémicos de alto riesgo, en concreto al ST-111 y ST-175 que son los más diseminados en nuestro país [9, 51, 57].

En cuanto a la distribución de estos clones epidémicos de alto riesgo a nivel nacional, en el **artículo 6** se estudió una cohorte multicéntrica de bacteriemias por *P. aeruginosa*, en la que participaron 10 hospitales distribuidos por toda la geografía española. En este estudio analizamos mediante MLST todos los aislamientos con *P. aeruginosa* XDR (81) y objetivamos que la gran mayoría de las cepas XDR (más del 90%) pertenecían a algunos de los clones epidémicos de alto riesgo, siendo el más frecuente el ST-175 (con 62 aislamientos), seguido del ST-111 (9), ST-235 (2) y ST-244 (2).

Por lo tanto, los resultados de todos estos estudios ponen en manifiesto la importante diseminación de estos clones epidémicos de alto riesgo de *P. aeruginosa* en nuestro medio en la última década. Es conocido que los principales clones epidémicos de *P. aeruginosa* a nivel mundial son el ST-111, ST-175 y el ST-235. A pesar de que el ST-235 es el más diseminado a nivel mundial [9, 12, 61, 64, 69], tanto los datos de nuestro hospital como en los del estudio multicéntrico coincidieron en que el high-risk clon más frecuente era el ST-175 seguido del ST-111. Estos resultados están en consonancia con otros estudios que también documentan que el ámbito europeo el clon más diseminado es el ST-175, seguido del ST-111 [9, 51, 61].

En cuanto al perfil fenotípico de los clones epidémicos predominantes en nuestros estudios, el ST-175 presenta resistencia a las familias de carbapenémicos, penicilinas y cefalosporinas antipseudomónicas, quinolonas, monobactam, aminoglucósidos y fosfomicina; conservando únicamente la sensibilidad a la colistina y a la amikacina. El clon ST-111, como se concluye de

lo expuesto previamente, puede presentar un fenotipo MDR no-XDR o MDR XDR en función de que conserve o no sensibilidad a los carbapenémicos. La característica fenotípica fundamental de estas cepas es la de presentar resistencia a cefepime con una sensibilidad conservada a ceftazidima. Junto la resistencia a la familia de cefalosporinas antipseudomónicas, estas cepas presentan resistencia a las penicilinas antipseudomónicas, a los aminoglucósidos y a las quinolonas por lo que muestran un perfil MDR. Además, el 40% de estas cepas presentan también resistencia a carbapenémicos [55], mostrando en estos casos un perfil de extrema resistencia.

Finalmente, en el **artículo 2** demostramos mediante estudios genotípicos que todas las infecciones por *P. aeruginosa* XDR de nuestro centro fueron causadas por el clon ST-175. Además, con este trabajo se confirmó que la relación de estos clones epidémicos con la transmisión exógena u horizontal. Así, cuando analizamos los focos de infección en función del patrón de resistencia de las cepas objetivamos que las infecciones producidas por cepas *P. aeruginosa* XDR se asociaban estadísticamente a focos relacionados con una mayor manipulación por parte de personal sanitario como los catéteres vasculares o los sondajes urinarios.

3.2. Estudio del comportamiento biológico y de posibles determinantes patogénicos de los high-risk clones de *P. aeruginosa*.

Por todo lo comentado hasta ahora, es de suponer que estos clones epidémicos tienen unas capacidades epidémicas peculiares que favorecen su expansión y diseminación a nivel internacional. Por un lado, deben tener una serie de determinantes que favorezcan su mayor adhesividad o transmisibilidad que expliquen su amplia diseminación mundial. Por otro lado, deben presentar una serie de características que les confiere una mayor capacidad para adquirir resistencia horizontal lo que explica su relación con perfiles de multirresistencia. Sin embargo, no está claro que esto se acompañe también de un comportamiento más virulento de estas cepas. La ausencia de estudios que analicen este último punto nos llevo a plantearnos una serie de trabajos orientados a evaluar el comportamiento de estos clones internacionales. En primer lugar, evaluamos algunos posibles determinantes patogénicos que pudieran explicar el éxito epidémico de estos clones. Y finalmente, evaluamos su comportamiento *in vivo* mediante un modelo animal analizando su capacidad de producir infección, respuesta inflamatoria y mortalidad.

En el **artículo 7** realizamos una serie de **estudios *in vitro*** con el objetivo de perfilar mejor las características microbiológicas de los estos clones y evaluar posibles determinantes patogénicos asociados a ellos. Mediante estudios de crecimiento *in vitro* observamos que dentro de los high-risk clones evaluados el ST-111 presentó mayores tiempos de duplicación, mientras que los clones ST-175 y ST-235 presentaron tiempos de duplicación similares. Al comparar los high-risk clones con las cepas sensibles documentamos que los primeros presentaban tiempos de duplicación superiores, es decir, peores tasas de crecimiento, coincidiendo con los resultados encontrados en un estudio reciente [62].

El sistema de secreción tipo III es uno de los principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* y dentro de este sistema, la expresión del genotipo *exoU*⁺ se asocia a una mayor virulencia [10]. En nuestros estudios *in vitro* documentamos que de los tres high-risk clones estudiados el ST-235 era el único que expresaba el genotipo *exoU*⁺. En el estudio multicéntrico del [artículo 6](#) se confirmó que el clon ST-235 era el único de los high-risk clones incluidos que presentaba el genotipo *exoU*⁺. En este trabajo se demostró que dicho genotipo se asociaba a una mayor mortalidad de pacientes con bacteriemia. En consonancia con dicho estudio, en nuestros estudios experimentales observamos que el único high-risk clon que produjo mortalidad en el modelo animal fue el ST-235 y era el único de los tres clones epidémicos que expresaba el genotipo *exoU*⁺. En cuanto a los otros determinantes patogénicos estudiados, el ST-235 presentó valores de citotoxicidad e invasividad superiores a los otros dos clones de alto riesgo estudiados. De hecho, el clon ST-235 fue la cepa clínica más citotóxica de todas las estudiadas, tanto de los clones de alto riesgo como de las cepas no epidémicas. Todos estos datos sugieren que, dentro de los clones epidémicos de alto riesgo, el ST-235 presenta una mayor virulencia y un comportamiento patogénico más agresivo.

A pesar de que el clon ST-235 presentó el determinante de virulencia *exoU*⁺ y una mayor citotoxicidad e invasividad, los otros clones de alto riesgo estudiados (ST-111 y ST-175) presentaron un genotipo *exoU*⁻ y sus valores de citotoxicidad e invasividad no fueron superiores a los de las otras cepas clínicas no epidémicas, por lo que probablemente los determinantes microbiológicos estudiados no sean los que expliquen el éxito epidémico de estos clones de alto riesgo. En este sentido, un estudio reciente evaluó los posibles determinantes patogénicos asociados a estos clones internacionales encontrando que dichos clones presentaron una mayor capacidad de producir biofilm y una mayor frecuencia de mutaciones espontáneas [62].

En cuanto al **comportamiento *in vivo*** de estos clones, mediante un modelo animal observamos que la capacidad de producir enfermedad, respuesta inflamatoria y mortalidad de estas cepas epidémicas era inferior a la que presentaban otras cepas no epidémicas y con perfil de sensibilidad a los fármacos antipseudomónicos. En el **trabajo 7** documentamos que la capacidad de producir mortalidad era claramente inferior en los clones epidémicos de alto riesgo que en las cepas no clonales y no multirresistentes. De hecho, mientras la mortalidad en el grupo de las no-MDR era 70% ($p < 0.001$), de los tres clones epidémicos de alto riesgo estudiados sólo el ST-235 fue capaz de producir mortalidad y esta fue inferior (30%) a la de las cepas no-MDR. Los otros dos high-risk clones estudiados (ST-111 y ST-175) no produjeron mortalidad en ninguno de los ratones.

En el **artículo 8**, al estudiar la respuesta inflamatoria a la infección encontramos resultados similares, de forma que al medir la elevación de las interleuquinas tras la infección objetivamos que los niveles de éstas eran bastante inferiores en los ratones inoculados por high-risk clones que en aquellos inoculados por clones no epidémicos y no multirresistentes. Al igual que observamos en los estudios de mortalidad, la cepa ST-235 se comportó de una forma más virulenta que los otros dos clones epidémicos analizados. Así, el ST-235 presentó un patrón de elevación de las interleuquinas parecido a las cepas no multirresistentes, aunque con una respuesta inflamatoria menor.

Las diferencias de comportamiento *in vivo* entre los tres clones epidémicos de alto riesgo podría explicarse en parte por las diferencias observadas en la expresión de determinantes de virulencia. Así, tanto en el **artículo 6** se demostró que el clon ST-235 es el único que expresa el genotipo *exoU^r*, que se asocia a una mayor virulencia. Además en el **artículo 7** se evidenció que dicho clon se asociaba a una mayor invasividad y citotoxicidad que los clones de alto riesgo ST-111 y ST-175.

La menor capacidad de producir infección, respuesta inflamatoria y mortalidad de estos high-risk clones podría explicarse porque la adquisición de mutantes de resistencia por parte de estas cepas se acompañara de un coste biológico que condicionara una menor capacidad virulenta. Así, en el estudio de Mulet *et al.* [62] se demostró que estos clones epidémicos fueron deficitarios en la expresión algunos factores de virulencia de *P. aeruginosa*, como la motilidad o la producción de pigmentos, y que presentaron menor fitness bacteriano en experimentos de competición.

Por lo tanto, los resultados de nuestros estudios clínicos ponen en manifiesto la importante diseminación de estos clones epidémicos de alto riesgo de *P. aeruginosa*, de forma que la mayoría de las infecciones por *P. aeruginosa* MDR/XDR son debidas a estos clones internacionales, siendo los más frecuentes en nuestro medio el ST-111 y ST-175. En cuanto a los estudios experimentales, demostramos que dentro de los high-risk clones predominantes a nivel mundial el ST-235 es el que presenta un comportamiento más virulento. Al comparar la patogenicidad de estos clones epidémicos internacionales con cepas no clonales y con un fenotipo de susceptibilidad antibiótica demostramos que los high-risk clones presentan unas tasas de crecimiento inferiores, una menor capacidad de producir infección, respuesta inflamatoria y mortalidad. Sin embargo, nuestros trabajos no son concluyentes a la hora de determinar cuáles son los determinantes microbiológicos específicos de estos clones que favorecen su diseminación y expansión a nivel mundial.

CONCLUSIONES

A. Comportamiento epidemiológico de *P. aeruginosa*.

Objetivo 1. Determinar la dinámica de colonización intestinal en pacientes críticos en función de los diferentes patrones de resistencia de *P. aeruginosa*.

- 1.1. La epidemiología de *P. aeruginosa* es compleja, pudiendo coexistir en un mismo medio varios clones epidémicos multirresistentes y cepas no epidémicas.
- 1.2. En el Hospital Universitari de Bellvitge se objetivó la diseminación de dos clones epidémicos internacionales de alto riesgo: el ST-111 y el ST-175. Estos clones fueron responsables de la totalidad de los aislamientos de *P. aeruginosa* con perfil de extremada resistencia y de más de la mitad de los aislamientos multirresistentes de nuestro hospital, lo que pone en evidencia su importancia.
- 1.3. La colonización intestinal por cepas de *P. aeruginosa* multirresistente fue más tardía que la colonización por cepas sensibles, debido a que la selección de cepas multirresistentes requiere un periodo de presión antibiótica previa.

Objetivo 2. Analizar el impacto de la colonización intestinal por *P. aeruginosa* en el desarrollo posterior de la infección: evaluar el posible valor de la colonización intestinal como predictor de infección.

- 2.1. El 90% de los pacientes que desarrollaron infección por *P. aeruginosa* habían presentado previamente colonización rectal por dicha bacteria, lo que demuestra que la colonización intestinal es un requerimiento clave para el desarrollo posterior de infección por *P. aeruginosa* en pacientes ingresados en la UCI.

Objetivo 3. Determinar el impacto de la exposición a antibióticos para la colonización e infección por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes y extremadamente resistentes.

- 3.1. El consumo de fluoroquinolonas y carbapenémicos, incluyendo el ertapenem, se identificó como factor de riesgo para la colonización por *P. aeruginosa* multirresistente, lo que plantea la necesidad de un control del consumo de dichas familias de antibióticos en un contexto epidémico o endémico de estas cepas.
- 3.2. El consumo previo de antibióticos y su duración se asociaron con el desarrollo de bacteriemias por *P. aeruginosa* multirresistente.
- 3.3. El consumo de fluoroquinolonas se identificó específicamente como factor de riesgo para el desarrollo de bacteriemias por *P. aeruginosa* extremadamente resistente.

B. Patogenicidad y virulencia clínica de *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia antimicrobiana.

B1. Invasividad clínica o capacidad de producir infección.

Objetivo 4. Evaluar la influencia de la multirresistencia en la capacidad de producir infección por *P. aeruginosa*.

- 4.1. Los pacientes colonizados por cepas de *P. aeruginosa* no multirresistentes desarrollaron con mayor frecuencia y precocidad infección que aquellos colonizados por cepas multirresistentes policlonales, lo que sugiere una mayor invasividad clínica de las cepas no multirresistentes.
- 4.2. Los pacientes colonizados con *P. aeruginosa* extremadamente resistente presentaron una mayor proporción de bacteriemia que los pacientes con otros fenotipos, probablemente debido a características especiales de estos linajes epidémicos más que a factores dependientes de la propia resistencia.

B2. Capacidad de producir respuesta inflamatoria.

Objetivo 5. Analizar la respuesta inflamatoria clínica y molecular de pacientes con infección por *P. aeruginosa* en función del patrón de resistencia.

- 5.1. La respuesta inflamatoria fue superior en las infecciones por *P. aeruginosa* extremadamente resistentes. Estos resultados pudieron deberse en parte al mayor porcentaje de bacteriemias en este grupo, ya que las infecciones bacteriémicas presentaron más respuesta inflamatoria que las no bacteriémicas.
- 5.2. Al analizar únicamente las infecciones bacteriémicas, la respuesta inflamatoria fue superior en las cepas no multirresistentes que en las multirresistentes.

B3. Letalidad.

Objetivo 6. Estudiar el impacto de la multirresistencia en el pronóstico de las neumonías asociadas a ventilación mecánica.

- 6.1. La mortalidad precoz fue mayor en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica causada por *P. aeruginosa* sensible que por cepas multirresistentes, a pesar de que las no multirresistentes recibieron con más frecuencia tratamiento adecuado. Esto sugiere que la multirresistencia se asocia a un coste biológico.

Objetivo 7. Investigar la influencia del genotipo de secreción tipo III (SSTT) y del patrón de resistencia en la mortalidad de las infecciones bacteriémicas por *P. aeruginosa*.

- 7.1. Las bacteriemias por *P. aeruginosa* multirresistente no se asociaron a un peor pronóstico, con una mortalidad atribuible semejante a la de las cepas no-MDR.
- 7.2. El genotipo *exoU*^r es uno de los principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* y su expresión se asoció a una mayor mortalidad precoz en las bacteriemias por *P. aeruginosa*. Este genotipo fue más frecuente entre los fenotipos no multirresistentes que entre los multirresistentes.

C. Patogenicidad y virulencia *in vitro* de *P. aeruginosa* según el patrón de resistencia.

Objetivo 8. Estudiar los principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* y evaluar su expresión en función del perfil de resistencia antibiótica.

8.1. La resistencia antimicrobiana se asoció a una reducción de las tasas de crecimiento *in vitro*, lo que indicaría que la capacidad de crecimiento y multiplicación bacteriana se encuentra comprometida en las cepas resistentes.

8.2. No se encontraron diferencias en el resto de parámetros biológicos estudiados *in vitro*. Probablemente otros determinantes no evaluados sean los responsables del diferente comportamiento observado *in vivo* entre cepas sensibles y resistentes.

D. Patogenicidad y virulencia *in vivo* de *P. aeruginosa* mediante un modelo experimentación animal.

Objetivo 9. Estudiar el impacto de la multirresistencia de *P. aeruginosa* en la capacidad de producir mortalidad en un modelo experimental animal.

9.1. Las cepas multirresistentes presentaron una menor mortalidad que las cepas sensibles; hecho que podría estar en relación con la existencia de un coste biológico asociado a la resistencia.

9.2. Dentro de los clones epidémicos de alto riesgo el ST-235 fue el único que expresó el determinante de virulencia *exoU^r*, el que presentó mayor invasividad y citotoxicidad *in vitro* y el único que produjo mortalidad en el modelo animal.

Objetivo 10. Determinar el impacto de la multirresistencia en la capacidad de producir enfermedad y respuesta inflamatoria en un modelo experimental animal.

10.1. Las cepas multirresistentes presentaron una menor capacidad de producir infección y provocaron una menor respuesta inflamatoria que las cepas sensibles, lo que sugiere una menor patogenicidad de las cepas multirresistentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Palleroni N.** Section 4. Gram-negative aerobic rods and cocci. Family I. Pseudomonadaceae. Genus I. *Pseudomonas*. In: Krieg N, Holt J, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MA, U.S.A.: The Williams and Wilkins Co.; 1984. p. 141–99.
2. **Pier G, Ramphal R.** *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell G, Bennet J, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia, U.S.A.: Churchill Livingstone / Elsevier; 2010. p. 2835–60.
3. **Kiska D, Gilligan P.** *Pseudomonas*. In: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover F, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, D.C.: American Society of Microbiology; 1999. p. 517–25.
4. **Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS.** *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirology*. 2010 Aug 16;15(7):1037–56.
5. **Gellatly SL, Hancock REW.** *Pseudomonas aeruginosa* : new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013 Apr;67(3):159–73.
6. **Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS.** Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun;171(11):1209–23.
7. **Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI.** Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect*. 2011 Dec;13(14-15):1133–45.
8. **Hogardt M, Heesemann J.** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol*. 2010 Dec;300(8):557–62.
9. **Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C.** The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat*. 2015 Jul;21-22:41–59.
10. **Engel J, Balachandran P.** Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Feb;12(1):61–6.

11. **Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Vallés J, Engel J, et al.** Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Care Med. 2002;30(3):521–8.
12. **Maatallah M, Cheriaa J, Backhrouf A, Iversen A, Grundmann H, Do T, et al.** Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. Redfield RJ, editor. PLoS One. 2011 Oct 3;6(10):e25617.
13. **Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F.** The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends Mol Med. 2004 Dec;10(12):599–606.
14. **Nadal Jiménez P, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ.** The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev. 2012 Mar 1;76(1):46–65.
15. **Cross AS, Sadoff JC, Iglewski BH, Sokol PA.** Evidence for the role of toxin A in the pathogenesis of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in humans. J Infect Dis. 1980 Oct 1;142(4):538–46.
16. **Baker N, Minor V, Deal C, Shahrabadi M, Simpson D, Woods D.** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesion. Infect Immun. 1991;59(9):2859–63.
17. **De Kievit TR.** Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environ Microbiol. 2009 Feb;11(2):279–88.
18. **Karatuna O, Yagci A.** Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. Clin Microbiol Infect. 2010 Dec;16(12):1770–5.
19. **Pedersen S, Kharazmi A, Espersen F, Høiby N.** *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response. Infect Immun. 1990;58(10):3363–8.

20. **Livermore DM.** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis. 2002 Mar 1;34(5):634–40.
21. **Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND.** Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009 Oct 1;22(4):582–610.
22. **Bonomo RA, Szabo D.** Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 2006 Sep 1;43(Supplement 2):S49–56.
23. **Andersson DI.** The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? Curr Opin Microbiol. 2006;9(5):461–5.
24. **Andersson DI, Hughes D.** Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Microbiol. 2010 Mar 16;8(4):260–71.
25. **Filloux A.** Fit and resistant is a worst case scenario with bacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Dec 17;110(51):20360–1.
26. **Livermore DM.** Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995 Oct;8(4):557–84.
27. **Rosenthal VD, Maki DG, Mehta Y, Leblebicioglu H, Memish ZA, Al-Mousa HH, et al.** International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module. Am J Infect Control. 2014 Sep;42(9):942–56.
28. **Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al.** Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the centers for disease control and prevention, 2009–2010. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013 Jan 2;34(1):1–14.
29. **Kaminski C, Timsit J-F, Dubois Y, Zahar J-R, Garrouste-Orgeas M, Vesin A, et al.** Impact of ureido/carboxypenicillin resistance on the prognosis of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Crit care. 2011;15(2):R112.

30. **Suárez C, Peña C, Gavaldà L, Tubau F, Manzur A, Domínguez MA, et al.** Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Int J Infect Dis.* 2010 Sep;14:e73–8.
31. **Bonten MJM, Bergmans DCJJ, Speijer H, Stobberingh EE.** Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Oct;160(4):1212–9.
32. **Peña C, Guzmán A, Suárez C, Domínguez MA, Tubau F, Pujol M, et al.** Effects of carbapenem exposure on the risk for digestive tract carriage of intensive care unit-endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun 1;51(6):1967–71.
33. **Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, et al.** Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med.* 2001 Aug;27(8):1263–8.
34. **Harris AD, Johnson JK, Thom KA, Morgan DJ, McGregor JC, Ajao AO, et al.** Risk factors for development of intestinal colonization with imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit setting. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011 Jul 2;32(07):719–22.
35. **Bergmans DCJJ, Bonten MJM, van Tiel FH, Gaillard CA, van der Geest S, Wilting RM, et al.** Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax.* 1998 Dec 1;53(12):1053–8.
36. **Vallés J, Mariscal D, Cortés P, Coll P, Villagrà A, Díaz E, et al.** Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* 2004 Sep 9;30(9):1768–75.
37. **Marshall JC, Christou N V, Meakins JL.** The gastrointestinal tract. The “undrained abscess” of multiple organ failure. *Ann Surg.* 1993 Aug;218(2):111–9.

38. **Blot S, Depuydt P, Vogelaers D, Decruyenaere J, Waele J De, Hoste E, et al.** Colonization status and appropriate antibiotic therapy for nosocomial bacteremia caused by antibiotic resistant gram negative bacteria in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005 Jun;26(6):575–9.
39. **Johnson JK, Smith G, Lee MS, Venezia RA, Stine OC, Nataro JP, et al.** The role of patient to patient transmission in the acquisition of imipenem resistant *P. aeruginosa* colonization in the intensive care unit. *J Infect Dis.* 2009 Sep 15;200(6):900–5.
40. **Olson B, Weinstein RA, Nathan C, Chamberlin W, Kabins SA.** Epidemiology of endemic *Pseudomonas aeruginosa*: why infection control efforts have failed. *J Infect Dis.* 1984 Dec;150(6):808–16.
41. **Suárez C, Peña C, Arch O, Domínguez MA, Tubau F, Juan C, et al.** A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. *BMC Infect Dis.* 2011 Dec 13;11(1):272.
42. **Reuter S, Sigge A, Wiedeck H, Trautmann M.** Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit Care Med.* 2002 Oct;30(10):2222–8.
43. **Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C.** *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Intensive Care Med.* 2007 Jul;33(7):1155–61.
44. **Paterson DL.** The role of antimicrobial management programs in optimizing antibiotic prescribing within hospitals. *Clin Infect Dis.* 2006 Jan 15;42 Suppl 2:S90–5.
45. **Rice LB.** Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008 Apr 15;197(8):1079–81.
46. **Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al.** Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009 Jan 1;48(1):1–12.

47. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015.
48. **Zilberberg MD, Shorr AF.** Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among specimens from hospitalized patients with pneumonia and bloodstream infections in the United States from 2000 to 2009. *J Hosp Med.* 2013 Oct;8(10):559–63.
49. **Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN.** Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Apr;43(4):328–34.
50. **Zhanel GG, DeCorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, Lagacé-Wiens P, et al.** Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Nov;54(11):4684–93.
51. **Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al.** Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Dec;56(12):6349–57.
52. **Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee.** Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control.* 2007 Dec;35(10 Suppl 2):S165–93.
53. **Climo MW, Yokoe DS, Warren DK, Perl TM, Bolon M, Herwaldt LA, et al.** Effect of daily chlorhexidine bathing on hospital-acquired infection. *N Engl J Med.* 2013 Feb 7;368(6):533–42.
54. **Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G, et al.** Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to

- imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Jan;30(1):25–33.
55. **Peña C, Suárez C, Tubau F, Juan C, Moya B, Domínguez MA, et al.** Nosocomial Outbreak of a Non-Cefepime-Susceptible Ceftazidime-Susceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strain Overexpressing MexXY-OprM and Producing an Integron-Borne PSE-1 ss-Lactamase. *J Clin Microbiol*. 2009 Aug 1;47(8):2381–7.
56. **Peña C, Suárez C, Tubau F, Gutiérrez O, Domínguez MA, Oliver A, et al.** Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Oct;13(10):1026–9.
57. **García-Castillo M, Campo R del, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, et al.** Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 spanish hospitals. *J Clin Microbiol*. 2011 Aug 1;49(8):2905–10.
58. **Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al.** Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Nov 1;53(11):4930–3.
59. **Van der Bij AK, Van der Zwan D, Peirano G, Severin JA, Pitout JDD, Van Westreenen M, et al.** Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Netherlands: the nationwide emergence of a single sequence type. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Sep;18(9):E369–72.
60. **Woodford N, Turton JF, Livermore DM.** Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Sep;35(5):736–55.

61. **Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, van der Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X.** Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol.* 2011 Jul;49(7):2578–83.
62. **Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, et al.** Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Nov;57(11):5527–35.
63. **Empel J, Filczak K, Mrówka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M.** Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol.* 2007 Sep;45(9):2829–34.
64. **Edelstein M V, Skleenova EN, Shevchenko O V, D'souza JW, Tapalski D V, Azizov IS, et al.** Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis.* 2013 Oct;13(10):867–76.
65. **Wright LL, Turton JF, Livermore DM, Hopkins KL, Woodford N.** Dominance of international “high-risk clones” among metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jan;70(1):103–10.
66. **Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Pérez F, et al.** Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Apr;59(4):2421–5.
67. **Samuelson O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, et al.** Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):346–52.
68. **Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN.** Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas*

- aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother. 2014 Jul;69(7):1804–14.
69. **Kim MJ, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Song JH, Choi JY, et al.** Dissemination of metallo-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of sequence type 235 in Asian countries. J Antimicrob Chemother. 2013 Dec 1;68(12):2820–4.
70. **Olivares J, Álvarez-Ortega C, Martínez JL.** Metabolic compensation of fitness costs associated with overexpression of the multidrug efflux pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jul 1;58(7):3904–13.
71. **Vogwill T, MacLean RC.** The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. Evol Appl. 2015 Mar;8(3):284–95.
72. **Komp Lindgren P, Marcusson LL, Sandvang D, Frimodt-Møller N, Hughes D.** Biological cost of single and multiple norfloxacin resistance mutations in *Escherichia coli* implicated in urinary tract infections. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jun;49(6):2343–51.
73. **Binet R, Maurelli AT.** Fitness cost due to mutations in the 16S rRNA associated with spectinomycin resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Nov;49(11):4455–64.
74. **Abdelraouf K, Kabbara S, Ledesma KR, Poole K, Tam VH.** Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 2011 Jun;66(6):1311–7.
75. **Nielsen KL, Pedersen TM, Udekwu KI, Petersen A, Skov RL, Hansen LH, et al.** Fitness cost: a bacteriological explanation for the demise of the first international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic. J Antimicrob Chemother. 2012 Jun;67(6):1325–32.
76. **Schulz zur Wiesch P, Engelstädter J, Bonhoeffer S.** Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. Antimicrob Agents Chemother. 2010 May;54(5):2085–95.

77. **Noto MJ, Fox PM, Archer GL.** Spontaneous deletion of the methicillin resistance determinant, *mecA*, partially compensates for the fitness cost associated with high-level vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* American Society for Microbiology (ASM); 2008 Apr 22;52(4):1221–9.
78. **Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM.** Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Feb;53(2):203–7.
79. **Björkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI.** Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science.* 2000 Feb 25;287(5457):1479–82.
80. **Besier S, Ludwig A, Brade V, Wichelhaus TA.** Compensatory adaptation to the loss of biological fitness associated with acquisition of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Apr;49(4):1426–31
81. **Kugelberg E, Löfmark S, Wretling B, Andersson DI.** Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jan;55(1):22–30.
82. **Ramadhan AA.** Survivability of vancomycin resistant enterococci and fitness cost of vancomycin resistance acquisition. *J Clin Pathol.* 2005 Jul 1;58(7):744–6.
83. **Criswell D, Tobiason VL, Lodmell JS, Samuels DS.** Mutations conferring aminoglycoside and spectinomycin resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Feb;50(2):445–52.
84. **Hirsch EB, Tam VH.** Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2010 Aug 9;10(4):441–51.
85. **Giamarellos-Bourboulis EJ, Plachouras D, Tzivra A, Kousoulas V, Bolanos N, Raftogiannis M, et al.** Stimulation of innate immunity by susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an *in vitro* and *in vivo* study. *Clin Exp Immunol.* 2004 Feb;135(2):240–6.

86. **Giamarellos-Bourboulis EJ, Koussoulas V, Panagou C, Adamis T, Baziaka F, Skiadas I, et al.** Experimental sepsis using *Pseudomonas aeruginosa*: the significance of multi-drug resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2004 Oct;24(4):357–61.
87. **Giamarellos-Bourboulis EJ, Tzepe I, Tsovolou I, Spyridaki A, Tsaganos T, Vaki I, et al.** Impact of multidrug resistance on experimental empyema by *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir Int Rev Thorac Dis*. 2011;82(1):46–53.
88. **Deptuła A, Gospodarek E.** Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Arch Microbiol*. 2010 Jan;192(1):79–84.
89. **Sun Z, Jiao X, Peng Q, Jiang F, Huang Y, Zhang J, et al.** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2013;31(2-3):347–54.
90. **Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, et al.** *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct 1;51(10):3531–6.
91. **Skurnik D, Roux D, Cattoir V, Danilchanka O, Lu X, Yoder-Himes DR, et al.** Enhanced *in vivo* fitness of carbapenem-resistant oprD mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 17;110(51):20747–52.
92. **Vardakas KZ, Rafailidis PI, Konstantelias AA, Falagas ME.** Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria: the study, the patient, the bug or the drug? *J Infect*. 2013 May;66(5):401–14.
93. **Klevens RM, Edwards JR, Gaynes RP, National Nosocomial Infections Surveillance System.** The impact of antimicrobial-resistant, health care-associated infections on mortality in the United States. *Clin Infect Dis*. 2008 Oct 1;47(7):927–30.

94. **Blot S, Vandewoude K, De Bacquer D, Colardyn F.** Nosocomial bacteremia caused by antibiotic resistant gram negative bacteria in critically ill patients: clinical outcome and length of hospitalization. *Clin Infect Dis.* 2002 Jun 15;34(12):1600–6.
95. **Carmeli Y, Troillet N, Karchmer AW, Samore MH.** Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Intern Med.* 1999 May 24;159(10):1127–32.
96. **Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, et al.** Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Feb;49(2):760–6.
97. **Neidell MJ, Cohen B, Furuya Y, Hill J, Jeon CY, Glied S, et al.** Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. *Clin Infect Dis.* 2012 Sep;55(6):807–15
98. **Cosgrove SE.** The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis.* 2006 Jan 15;42 Suppl 2:S82–9.
99. **Moehring RW, Sloane R, Chen LF, Smathers EC, Schmader KE, Fowler VG, et al.** Delays in appropriate antibiotic therapy for gram-negative bloodstream infections: a multicenter, community hospital study. Chowell G, editor. *PLoS One.* 2013 Oct 3;8(10):e76225.
100. **Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ.** Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest.* 1999 Feb;115(2):462–74.
101. **Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH.** The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest.* 2000 Jul;118(1):146–55.

- 102. Depuydt PO, Vandijck DM, Bekaert MA, Decruyenaere JM, Blot S, Vogelaers DP, et al.** Determinants and impact of multidrug antibiotic resistance in pathogens causing ventilator-associated-pneumonia. *Crit care*. 2008;12(6):R142.
- 103. Lambert M-L, Suetens C, Savey A, Palomar M, Hiesmayr M, Morales I, et al.** Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2011 Jan;11(1):30–8.
- 104. Arvanitis M, Anagnostou T, Kourkoumpetis TK, Ziakas PD, Desalermos A, Mylonakis E.** The impact of antimicrobial resistance and aging in VAP outcomes: experience from a large tertiary care center. Moldawer LL, editor. *PLoS One*. 2014 Feb 27;9(2):e89984.
- 105. Planquette B, Timsit J-F, Misset BY, Schwebel C, Azoulay E, Adrie C, et al.** *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia. predictive factors of treatment failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jul 1;188(1):69–76.
- 106. Peña C, Suárez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al.** Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1265–72.
- 107. Lye DC, Earnest A, Ling ML, Lee T-E, Yong H-C, Fisher DA, et al.** The impact of multidrug resistance in healthcare-associated and nosocomial Gram-negative bacteraemia on mortality and length of stay: cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2012 May;18(5):502–8.
- 108. Tumbarello M, Repetto E, Trecarichi EM, Bernardini C, De Pascale G, Parisini A, et al.** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and mortality. *Epidemiol Infect*. 2011 Nov;139(11):1740–9.
- 109. Tam VH, Rogers CA, Chang K-T, Weston JS, Caeiro J-P, Garey KW.** Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Sep;54(9):3717–22.

110. **Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y.** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jan;50(1):43–8.
111. **Robertson CM, Coopersmith CM.** The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes Infect.* 2006 Apr;8(5):1382–9.
112. **Hoesel LM, Ward PA.** Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. *Drug Discov today Dis Mech.* 2004 Dec;1(3):345–50.
113. **American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference:** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992 Jun;20(6):864–74.
114. **van der Poll T.** Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect Dis.* 2001 Oct;1(3):165–74.
115. **Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS.** New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct;25(4):609–34.
116. **Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D.** Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* 2013 Mar;13(3):260–8.
117. **Ulloa L, Tracey KJ.** The “cytokine profile”: a code for sepsis. *Trends Mol Med.* 2005 Feb;11(2):56–63.
118. **Hotchkiss RS, Karl IE.** The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003 Jan 9;348(2):138–50.
119. **Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH.** Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 2012 Jan 19;119(3):651–65.
120. **Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI.** Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect.* 2011 Dec;13(14-15):1133–45.
121. **Tracey KJ, Cerami A.** Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med.* 1994;45:491–503.

122. **Rincón M.** Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol.* 2012 Nov;33(11):571–7.
123. **Meynaar IA, Droog W, Batstra M, Vreede R, Herbrink P.** In critically ill patients, serum procalcitonin is more useful in differentiating between sepsis and SIRS than CRP, Il-6, or LBP. *Crit Care Res Pract.* 2011;2011:594-645.
124. **Cyktor JC, Turner J.** Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infect Immun.* 2011 Aug 1;79(8):2964–73.
125. **Opal SM, Wherry JC, Grint P.** Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 1998 Dec;27(6):1497–507.
126. **Dahaba AA, Metzler H.** Procalcitonin’s role in the sepsis cascade. Is procalcitonin a sepsis marker or mediator? *Minerva Anesthesiol.* 75(7-8):447–52.
127. **Müller B, Becker KL.** Procalcitonin: how a hormone became a marker and mediator of sepsis. *Swiss Med Wkly.* 2001 Oct 20;131(41-42):595–602.
128. **Becker KL, Nylén ES, White JC, Müller B, Snider RH.** Clinical review 167: procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Apr;89(4):1512–25.
129. **Kibe S, Adams K, Barlow G.** Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Apr 1;66(Supplement 2):ii33–40.
130. **Gilbert DN.** Use of plasma procalcitonin levels as an adjunct to clinical microbiology. *J Clin Microbiol.* 2010 Jul 1;48(7):2325–9.
131. **Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J.** Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2004 Jul 15;39(2):206–17.
132. **Wine JJ.** The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest.* 1999 Feb;103(3):309–12.

- 133. National Research Council. Committee of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research.** Use of laboratory animals in biomedical and behavioral research. Washington, D.C.: National Academy of Sciences; 1988. 102 p.
- 134. Trull FL, Rich BA.** More regulation of rodents. *Science*. 1999 May 28;284(5419):1463.
- 135. Rodríguez Yunta E.** Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioeth*. 2007 Jun;13(1).
- 136. Russell WMS, Burch RL.** The principles of humane experimental technique. London: Methuen & Co.; 1959. 238 p.
- 137. Goldberg AM, Zurlo J, Rudacille D.** The three Rs and biomedical research. *Science*. 1996 Jun 7;272(5267):1403.
- 138. Frimodt-Møller N.** The mouse peritonitis model: present and future use. *J Antimicrob Chemother*. 1993 May;31 Suppl D:55–60.
- 139. Frimodt-Møller N, Knudsen JD, Espersen F.** The mouse peritonitis/sepsis model. In: Zak O, Sande MA, editors. *Handbook of animals of models of infection*. London, U. K.: Academic Press; 1999. p. 127–36.
- 140. Domenech A, Ribes S, Cabellos C, Domínguez MA, Montero A, Liñares J, et al.** A mouse peritonitis model for the study of glycopeptide efficacy in GISA infections. *Microb Drug Resist*. 2004;10(4):346–53.
- 141. Domenech A, Ribes S, Cabellos C, Taberner F, Tubau F, Domínguez MA, et al.** Experimental study on the efficacy of combinations of glycopeptides and -lactams against *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jul 26;56(4):709–16.
- 142. Scholl D, Martin DW.** Antibacterial efficacy of R-type pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a murine peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 May 1;52(5):1647–52.

- 143. Barekzi NA, Poelstra KA, Felts AG, Rojas IA, Slunt JB, Grainger DW.** Efficacy of locally delivered polyclonal immunoglobulin against *Pseudomonas aeruginosa* peritonitis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother.* American Society for Microbiology; 1999 Jul 30;43(7):1609–15.
- 144. Azoulay E, Rieux V, Muffat-Joly M, Bédos J-P, Vallée E, Rivier C, et al.** Relationship between capsular type, penicillin susceptibility, and virulence of human *Streptococcus pneumoniae* isolates in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Jun;44(6):1575–7.
- 145. López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, McConnell MJ, Docobo-Peréz F, Smani Y, Fernández-Reyes M, et al.** Impaired virulence and *in vivo* fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis.* 2011 Feb 15;203(4):545–8.
- 146. Tsai Y-K, Fung C-P, Lin J-C, Chen J-H, Chang F-Y, Chen T-L, et al.** *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Apr 1;55(4):1485–93.
- 147. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):268–81.
- 148. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM.** CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control.* 1988 Jun;16(3):128–40.
- 149. Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens JP, Lew PD, Suter PM.** Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic “blind” bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis.* 1991 May;143(5 Pt 1):1121–9.
- 150. Craven DE, Hjalmarson KI.** Ventilator-associated tracheobronchitis and pneumonia: thinking outside the box. *Clin Infect Dis.* 2010 Aug 1;51 Suppl 1:S59–66.
- 151. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al.** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The

- ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1644–55.
152. **Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al.** The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996 Jul;22(7):707–10.
153. **Le Gall JR, Loirat P, Alperovitch A, Glaser P, Granthil C, Mathieu D, et al.** A simplified acute physiology score for ICU patients. *Crit Care Med*. 1984 Nov;12(11):975–7.
154. **Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, et al.** Enterobacter bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med*. 1991 Oct 15;115(8):585–90.
155. **Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR.** A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40(5):373–83.
156. **American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America.** Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Feb 15;171(4):388–416.
157. **Murray PR, Baron EJ, Pfaller M, Tenover F, Tenover F, Tenover F, Yolken R, editors.** Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1999. 773 p.
158. **Croxatto A, Prod'hom G, Greub G.** Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Mar;36(2):380–407.
159. **CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2012. 188 p.

160. **Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, et al.** Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1198–204.
161. **Smith CL, Cantor CR.** Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods Enzymol.* 1987;155:449–67.
162. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233–9.
163. **Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG.** Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004 Dec;42(12):5644–9.
164. **Jolley KA, Chan M-S, Maiden MCJ.** mlstDbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics.* 2004 Jul 1;5:86.
165. **Shariff SZ, Cuerden MS, Jain AK, Garg AX.** The secret of immortal time bias in epidemiologic studies. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2008 May;19(5):841–3.
166. **Lévesque LE, Hanley JA, Kezouh A, Suissa S.** Problem of immortal time bias in cohort studies: example using statins for preventing progression of diabetes. *Br Med J (Clin Res Ed).* 2010;340:b5087.
167. **Noone MR, Pitt TL, Bedder M, Hewlett AM, Rogers KB.** *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in an intensive therapy unit: role of cross infection and host factors. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983 Jan 29;286(6362):341–4.
168. **Ohara T, Itoh K.** Significance of *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract. *Intern Med.* 2003 Nov;42(11):1072–6.
169. **Latibeaudiere R, Rosa R, Laowansiri P, Arheart K, Namias N, Muñoz-Price LS.** Surveillance cultures growing carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* predict

the development of clinical infections: a retrospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2015 Feb 1;60(3):415–22.

170. **Philippe E, Weiss M, Shultz JM, Yeomans F, Ehrenkranz NJ.** Emergence of highly antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in relation to duration of empirical antipseudomonal antibiotic treatment. *Clin Perform Qual Health Care*. 7(2):83–7.
171. **Paramythiotou E, Lucet J-C, Timsit J-F, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Trouillet J-L, et al.** Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis*. 2004 Mar 1;38(5):670–7.
172. **Troillet N, Samore MH, Carmeli Y.** Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin Infect Dis*. 1997 Nov;25(5):1094–8.
173. **Falagas ME, Karageorgopoulos DE.** Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 1;46(7):1121–2; author reply 1122.
174. **Lepelletier D, Cady A, Caroff N, Marraillac J, Reynaud A, Lucet J-C, et al.** Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal carriage among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Jan;66(1):1–6.
175. **Cao B, Wang H, Sun H, Zhu Y, Chen M.** Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Hosp Infect*. 2004 Jun;57(2):112–8.
176. **Montero M, Sala M, Riu M, Belvis F, Salvado M, Grau S, et al.** Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. Impact of antibiotic use in a double case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Mar;29(3):335–9

- 177. Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N, Gouby A, Mahamat A, Daurès JP, et al.** Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *J Hosp Infect.* 2004 Jul;57(3):209–16.
- 178. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M.** Selectivity of ertapenem for *Pseudomonas aeruginosa* mutants cross-resistant to other carbapenems. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Mar;55(3):306–11.
- 179. Vainio S, van Doorn-Schepens M, Wilhelm A, Vandenbroucke-Grauls C, Murk J-L, Debets-Ossenkopp Y.** Rapid selection of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by clinical concentrations of ertapenem. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 May;41(5):492–4.
- 180. Carmeli Y, Lidji SK, Shabtai E, Navon-Venezia S, Schwaber MJ.** The effects of group 1 versus group 2 carbapenems on imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an ecological study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 Jul;70(3):367–72.
- 181. Nicolau DP, Carmeli Y, Crank CW, Goff DA, Graber CJ, Lima ALL, et al.** Carbapenem stewardship: does ertapenem affect *Pseudomonas* susceptibility to other carbapenems? A review of the evidence. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Jan;39(1):11–5.
- 182. Cook PP, Gooch M, Rizzo S.** Reduction in fluoroquinolone use following introduction of ertapenem into a hospital formulary is associated with improvement in susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to group 2 carbapenems: a 10-year study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1752 N St., N.W., Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 2011 Dec 28;55(12):5597–601.
- 183. Sousa D, Castelo-Corral L, Gutiérrez-Urbón J-M, Molina F, López-Calviño B, Bou G, et al.** Impact of ertapenem use on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* imipenem susceptibility rates: collateral damage or positive effect on hospital ecology? *J Antimicrob Chemother.* 2013 Aug;68(8):1917–25.

- 184. Cohen MJ, Block CS, Moses AE, Nir-Paz R.** Exposure to ertapenem is possibly associated with *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance. Clin Microbiol Infect. 2014 Mar;20(3):O188–96.
- 185. Poole K.** Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology; 2000 Sep;44(9):2233–41.
- 186. López-Dupla M, Martínez J-A, Vidal F, Almela M, Soriano A, Marco F, et al.** Previous ciprofloxacin exposure is associated with resistance to beta-lactam antibiotics in subsequent *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates. Am J Infect Control. 2009 Nov;37(9):753–8.
- 187. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH.** Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jun;43(6):1379–82.
- 188. Guo B, Abdelraouf K, Ledesma KR, Nikolaou M, Tam VH.** Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. J Antimicrob Chemother. 2012 Apr;67(4):928–32.
- 189. Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, et al.** Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. J Exp Med. 2002 Jul 1;196(1):109–18.
- 190. Di Pasquale M, Ferrer M, Esperatti M, Crisafulli E, Giunta V, Li Bassi G, et al.** Assessment of severity of ICU-acquired pneumonia and association with etiology. Crit Care Med. 2014 Feb;42(2):303–12.

ANEXOS

ANEXO I. Artículos incluidos en la tesis doctoral

Antibiotic Pressure Is a Major Risk Factor for Rectal Colonization by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Critically Ill Patients

Silvia Gómez-Zorrilla,^a Mariana Camoez,^b Fe Tubau,^b Elisabet Periche,^c Rosario Cañizares,^c M. Angeles Dominguez,^b Javier Ariza,^a Carmen Peña^a

Infectious Diseases Service,^a Microbiology Service,^b and Intensive Care Service,^c IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, University of Barcelona, Barcelona, Spain

The intestinal reservoir is central to the epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, but the dynamics of intestinal colonization by different phenotypes have been poorly described. To determine the impact of antimicrobial exposure on intestinal colonization by multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa*, we screened intensive care unit (ICU) patients for rectal colonization on admission and at weekly intervals. During an 18-month study period, 414 ICU patients were enrolled, of whom 179 (43%) were colonized; 112 (63%) of these were identified at ICU admission and 67 (37%) during their ICU stay. At 10 days after ICU admission, the probabilities of carriage were 44%, 24%, and 24% for non-MDR, MDR-non-XDR, and XDR *P. aeruginosa* strains, respectively (log rank, 0.02). Pulsed-field gel electrophoresis showed 10 pairs of non-MDR *P. aeruginosa* and subsequent MDR-non-XDR strains isolated from the same patients to be clonally identical and another 13 pairs (8 MDR-non-XDR and 5 XDR) to be unrelated. There was one specific clone between the 8 MDR-non-XDR strains and an identical genotype in the 5 XDR isolates. The Cox regression analysis identified MDR *P. aeruginosa* acquisition as associated with the underlying disease severity (adjusted hazard ratio [aHR], 1.97; 95% confidence interval [CI], 1.22 to 3.18; $P = 0.006$) and prior use of fluoroquinolones (aHR, 1.02; 95% CI, 1.00 to 1.04; $P = 0.039$), group 2 carbapenems (aHR, 1.03; 95% CI, 1.00 to 1.07; $P = 0.041$), and ertapenem (aHR, 1.08; 95% CI, 1.02 to 1.14; $P = 0.004$). The epidemiology of MDR *P. aeruginosa* is complex, and different clusters may coexist. Interestingly, ertapenem was found to be associated with the emergence of MDR isolates.

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common nosocomial pathogens worldwide, and continuously evolving resistance to multiple antimicrobial agents has become a significant health problem. The control of multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* in intensive care units (ICUs) is an important method for preserving the limited number of drugs available for treating *P. aeruginosa* infections. However, this control is difficult to achieve because the path of emergence and dissemination of MDR *P. aeruginosa* is not fully understood. As an endogenous source of endemic or epidemic infection with Gram-negative bacilli (GNB), the intestinal reservoir is central to the epidemiology of *P. aeruginosa* because prior rectal colonization is typically present in most patients developing GNB infections (1).

Several studies have demonstrated that prior antimicrobial drug exposure is also a strong risk factor for colonization with a drug-resistant pathogen (2, 3). In fact, we have previously reported an association between carbapenem and fluoroquinolone consumption with the probability of colonization by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in ICU patients (4).

In recent years, important changes have occurred in the epidemiology of MDR *P. aeruginosa*. First, in addition to the characteristic polyclonal pattern of endogenous *P. aeruginosa*, a newly identified epidemic clonal pattern has been described during MDR *P. aeruginosa* outbreaks (5). Second, several reports have provided strong evidence for the existence of MDR *P. aeruginosa* high-risk clones (6), with biological parameters that may explain the success of these specific clones (7). Finally, a recent consensus document (8) proposed a set of MDR definitions in pathogenic bacteria that may improve the comparability of surveillance data. To our knowledge, no study has applied these new definitions to the epidemiological behavior of MDR *P. aeruginosa* and extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa*. In addition, the impact of ertapenem use over time is an issue of recent controversy (9).

For all these reasons, we decided to analyze the influence of antimicrobial use on intestinal *P. aeruginosa* colonization in ICU patients. Additionally, we assessed the temporal changes and the dynamic characteristics of intestinal colonization by different PA phenotypes in ICU patients after the start of antibiotic therapy. This study aimed to compare the probability of intestinal colonization by non-MDR *P. aeruginosa* and MDR *P. aeruginosa* strains and to assess the relationship between the duration of antibiotic therapy exposure and intestinal colonization with *P. aeruginosa*.

MATERIALS AND METHODS

We conducted a prospective cohort study of patients admitted to a medical-surgical ICU at the Hospital Universitari de Bellvitge between January 2012 and June 2013. All samples and examinations were performed as part of the standard care procedures for epidemiological control in this population. The local ethics committee of our hospital approved the study, and the patients or family provided informed consent.

Study design. We conducted an active surveillance program with ICU patients. Weekly rectal swab samples to detect digestive tract carriage of *P. aeruginosa* were obtained immediately on ICU admission and between ICU admission and discharge. To study patients at risk for digestive tract carriage during their ICU stay, all patients admitted to the unit for more than 48 h were included. We collected the following information for each patient: demographic data, including sex, age, hospital admission date, ICU admission date, and ICU discharge date; and severity of the acute

Received 22 May 2014 Returned for modification 16 June 2014

Accepted 16 July 2014

Published ahead of print 21 July 2014

Address correspondence to Carmen Peña, cpena@bellvitgehospital.cat.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.03419-14

illness on ICU admission using the simplified acute physiologic score (SAPS) (10) and the Charlson comorbidity index (11).

Definitions. We defined ICU admission carriers as patients with *P. aeruginosa*-positive culture samples at ICU admission. We defined ICU-acquired carriers as patients with *P. aeruginosa*-negative culture samples at ICU admission, who developed a *P. aeruginosa*-positive culture either during ICU admission or at ICU discharge. In addition, we defined new ICU-acquired carriers as patients in whom the *P. aeruginosa* phenotype isolated in a rectal sample differed from that of a previous isolate.

The phenotype stratification of *P. aeruginosa* isolates was made in accordance with recent standard definitions (8). MDR *P. aeruginosa* was defined as a strain nonsusceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antipseudomonal antimicrobial categories. XDR *P. aeruginosa* was defined as a strain nonsusceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 antipseudomonal antimicrobial categories; thus, XDR *P. aeruginosa* isolates were included as MDR *P. aeruginosa*. To study the specific epidemiology of XDR *P. aeruginosa*, MDR *P. aeruginosa* isolates were distributed as follows: XDR *P. aeruginosa* as defined above and MDR-non-XDR *P. aeruginosa* defined as *P. aeruginosa* strains nonsusceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antipseudomonal antimicrobial categories, but susceptible in at least > 2 antipseudomonal antimicrobial classes. All other *P. aeruginosa* isolates, including those nonsusceptible to ≥ 1 agent in < 3 antimicrobial categories, were considered non-MDR *P. aeruginosa*. Thus, three phenotypes of *P. aeruginosa* isolates were considered: non-MDR, MDR-non-XDR, and XDR. Only the first *P. aeruginosa* isolate of a specific phenotype was taken into account for each patient. Isolates of different phenotypes in the same patient were considered to be differentiated colonization episodes.

The length of exposure to antibiotic therapy for patients colonized by *P. aeruginosa* was defined by the number of days of therapy with different groups of antibiotics that a patient had received in the 3 months prior to hospital admission and until *P. aeruginosa* rectal colonization. The antibiotics analyzed were non-antipseudomonal penicillins (penicillin G, ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, and cloxacillin), antipseudomonal penicillin (piperacillin-tazobactam), non-antipseudomonal cephalosporins, antipseudomonal cephalosporins (ceftazidime and cefepime), aztreonam, aminoglycosides, glycopeptides, fluoroquinolones, group 2 antipseudomonal carbapenems (meropenem and imipenem), and erapenem (group 1 carbapenem). For new ICU-acquired carrier status, the length of exposure to antibiotic therapy was calculated to the date of the new positive sample. For patients not colonized by *P. aeruginosa*, the length of exposure was defined as the number of days of prior antibiotic consumption to the date of withdrawal or ICU discharge.

Microbiological studies. We identified *P. aeruginosa* strains and tested for their antimicrobial susceptibility using a MicroScan automated microdilution system with CN1S and CO1S panels (Dade International, West Sacramento, CA). The Clinical and Laboratory Standards Institute criteria (12) were used to define susceptibility or resistance to these antimicrobial agents. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), as described previously (13), was used to determine the relatedness for patients who acquired intestinal colonization of *P. aeruginosa* and who subsequently acquired different phenotypes of *P. aeruginosa*. The DNA restriction patterns generated by the PFGE, using SpeI (New England BioLabs, Izasa, Spain), were interpreted according to the criteria established by Tenover et al. (14). We selected 23 pairs of susceptible and multiresistant strains from 23 patients, with each isolated pair originating from the same patient. This resulted in 18 paired samples of non-MDR *P. aeruginosa* and MDR-non-XDR *P. aeruginosa* strains and 5 paired samples of non-MDR *P. aeruginosa* and XDR *P. aeruginosa* strains. In addition, a PFGE analysis was performed in all MDR *P. aeruginosa* isolates (37 MDR-non-XDR and 46 XDR phenotype strains). Multilocus sequence typing (MLST) as previously described (15) for the *P. aeruginosa* MLST database (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) was used to assign sequence types (16) in one representative isolate from each of the two major clones (5, 17).

Statistical analysis. Quantitative variables were tested for normal distribution and compared by the two-tailed *t* test or Mann-Whitney *U* test.

The chi-square test or Fisher's exact test was used to compare categorical variables. Variables with a *P* value of < 0.05 were considered statistically significant. Carriers were defined as those patients with at least one *P. aeruginosa*-positive rectal test result. Only the first *P. aeruginosa* isolate of a specific phenotype in each patient was included in the analysis (non-MDR, MDR-non-XDR, and XDR), and they were considered different colonization episodes in the same patient. The time at risk (in days) for ICU acquisition carriers and new ICU acquisition carriers was defined as the time elapsed from ICU admission to *P. aeruginosa* isolation for colonized patients; for noncolonized patients, we used the length of the ICU stay.

The probability of *P. aeruginosa* carriage in the digestive tract was calculated using the Kaplan-Meier method: the outcome evaluated was *P. aeruginosa* colonization, using the date of ICU admission as time zero. Patients were monitored to ICU discharge. Only patients with a negative baseline sample at ICU admission were included in this analysis.

To assess the risk factors for MDR *P. aeruginosa* colonization, we included all first episodes of *P. aeruginosa* colonization (according to phenotype stratification) and all noncolonized patients. To control for confounding, multivariate analyses were performed by Cox regression, using time to colonization as the dependent variable and MDR *P. aeruginosa* (MDR-non-XDR and XDR) colonization as the explanatory variable of interest. In the crude analysis, variables associated with exposure were candidates for multivariate analysis at a *P* value of < 0.20 . Data were analyzed using the SPSS statistical software package (version 15.0; SPSS Institute Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Epidemiological characteristics. Over a period of 18 months, a cohort of 414 patients had culture samples obtained on ICU admission, with 936 rectal swabs being taken in total. Of these, 206 (50%) were screened once, while 208 (50%) had at least 2 swabs (range, 2 to 12 swabs). During their ICU stay, 179 (43%) patients had a *P. aeruginosa*-positive rectal sample (112 [63%] at ICU admission and 67 [37%] during ICU admission), while 235 (57%) patients had no evidence of colonization. Among the 179 carriers, 143 (80%) were colonized by a single resistance phenotype at ICU discharge, and 34 (20%) were colonized by different *P. aeruginosa* resistance phenotypes. The key epidemiological characteristics of patients included in the study are illustrated in Table 1.

The prevalence of *P. aeruginosa* colonization at ICU admission was 27% (112/414 patients): 89 (22%) for non-MDR *P. aeruginosa*, 6 (1%) for MDR-non-XDR *P. aeruginosa*, and 17 (4%) for XDR *P. aeruginosa*. In addition, the prevalence of ICU-acquired *P. aeruginosa* colonization was 22% (67/302 patients): 43 (14%) for non-MDR, 11 (4%) for MDR-non-XDR, and 13 (4%) for XDR. Finally, among the *P. aeruginosa*-colonized patients, 36 new carrier episodes were observed in 34 patients (8%) during their ICU stay (Fig. 1). Thus, the total number of *P. aeruginosa* episodes was 215: 132 non-MDR and 83 MDR (37 MDR-non-XDR and 46 XDR) episodes.

Microbiological and genotypic analysis. Among the 37 MDR-non-XDR isolates analyzed, 13 were polyclonal and 19 had genotypes identical to previously described isolates (17) and were identified as the ST111 clone; the remaining 5 had clonal relatedness by PFGE, suggesting the occurrence of another cluster. In addition, XDR *P. aeruginosa* isolates were comparable with those of the predominant endemic clone in our hospital (5) and belonged to the ST175 strain. Identical susceptibility patterns were observed in all XDR *P. aeruginosa* strains; only amikacin and colistin retained activity in the XDR phenotype.

PFGE analysis of 18 pairs of non-MDR isolated from the same

TABLE 1 Epidemiological characteristics of the 414 ICU patients included in the study

Characteristic	Results at ICU admission for patients with:		P
	<i>P. aeruginosa</i> intestinal colonization (n = 112)	No <i>P. aeruginosa</i> intestinal colonization (n = 302)	
Age (mean ± SD) (yr)	65.3 ± 13.3	62.2 ± 14.3	0.049
Male sex (no. [%])	78 (69)	186 (61)	0.13
Prior hospital stay			
No. (%)	74 (66)	136 (45)	<0.001
Days (median [IQR ^a])	5 (2–12)	2 (0–7)	<0.001
Charlson index (mean ± SD)	2.7 ± 1.9	2.5 ± 2.1	0.40
SAPS II score (mean ± SD)	45.8 ± 14.5	43.0 ± 13.0	0.059
Prior antibiotic exposure (no. [%])			
Fluoroquinolones	18 (16)	61 (20)	0.34
Group 2 carbapenems	20 (18)	73 (24)	0.17
Group 1 carbapenems	7 (6)	20 (7)	0.89
Aminoglycosides	4 (4)	20 (7)	0.24
Colistin	2 (2)	10 (3)	0.41
Monobactam/antipseudomonal cephalosporins	12 (11)	32 (11)	0.97
Non-antipseudomonal cephalosporins	7 (6)	46 (15)	0.015
Antipseudomonal penicillins	17 (15)	104 (34)	<0.001
Non-antipseudomonal penicillins	33 (29.5)	89 (29.5)	0.99
Glycopeptides	11 (10)	48 (16)	0.11
Total days prior antibiotics (median [IQR])	9 (2–22)	10.5 (4–21)	0.22

^a IQR, interquartile range.

patients were clonally identical in 10 pairs (56%) of subsequent MDR-non-XDR strains. The remaining 8 pairs (44%) were unrelated to the non-MDR *P. aeruginosa* strain by PFGE; additionally, all these 8 MDR-non-XDR strains showed clonal relatedness. In the remaining pairs, 5 non-MDR and subsequent XDR had isolates with PFGE patterns that were unrelated to prior *P. aeruginosa* isolates but similar to those obtained from other patients (Table 2). These data confirmed clonal dissemination of both MDR-non-XDR and XDR-*P. aeruginosa* isolates in the ICU (5, 17).

Dynamics of intestinal *P. aeruginosa* colonization. The unadjusted probabilities of *P. aeruginosa* carriage were analyzed among the 302 noncarriers identified at ICU admission. The mean ICU stay for 235 noncolonized patients was 10.8 ± 9.2 days versus 15.6 ± 10.5 days for 67 colonized patients ($P = 0.001$). Of these colonized patients, we identified 97 episodes: 67 initial episodes of ICU-acquired colonization and 30 subsequent new carrier episodes (Fig. 1). At 10 days after ICU admission, the probabilities of *P. aeruginosa* carriage were 44%, 24%, and 24% for non-MDR, MDR-non-XDR, and XDR-*P. aeruginosa* strains, respectively (log rank, $P = 0.02$) (Fig. 2). Although the epidemic nature of an MDR-*P. aeruginosa* strain might promote spread and facilitate more rapid exogenous *P. aeruginosa* colonization, nonstatistically significant differences existed in digestive tract carriage of polyclonal and clonal MDR-non-XDR *P. aeruginosa* strains (log rank, $P = 0.37$).

Of note, among the 235 noncolonized patients, 30 (13%) with a median ICU stay of 25 days (interquartile range [IQR], 21.75 to 37.25) and a median antibiotic duration of 23.5 days (IQR, 16.75 to 33.25) remained noncolonized during their ICU stay.

Risk factors for MDR-*P. aeruginosa* carriage. In total, 450 patient episodes were included (Fig. 1): 235 noncolonized, 132

colonized with non-MDR *P. aeruginosa*, and 83 colonized with MDR *P. aeruginosa* (37 MDR-non-XDR and 46 XDR). We tried to define the patients at risk of acquiring intestinal colonization with MDR *P. aeruginosa* (MDR-non-XDR and XDR). The demographic characteristics and variables examined as possible risk factors are displayed in Table 3. A Cox regression model was adjusted for underlying condition severity, acute illness severity at the ICU admission, and duration of prior fluoroquinolone, group 2 carbapenem, ertapenem, colistin, and piperacillin-tazobactam consumption as input variables. The model identified underlying condition severity (adjusted hazard ratio [aHR], 1.97; 95% confidence interval [CI], 1.22 to 3.18; $P = 0.006$) and prior fluoroquinolone (aHR, 1.02; 95% CI, 1.00 to 1.04; $P = 0.039$), group 2 carbapenem (aHR, 1.03; 95% CI, 1.00 to 1.07; $P = 0.041$), and ertapenem (aHR, 1.08; 95% CI, 1.02 to 1.14; $P = 0.004$) consumption as independently associated with MDR *P. aeruginosa* intestinal colonization.

Analysis was performed in 37 episodes of MDR-non-XDR *P. aeruginosa* colonization (13 polyclonal and 24 clonal isolates) based on the different molecular epidemiology and behavior of polyclonal and clonal strains. Cox regression identified prior ertapenem use (aHR, 1.10; 95% CI, 1.01 to 1.19; $P = 0.026$) as the only independent variable associated with the risk of clonal versus polyclonal MDR-non-XDR intestinal colonization (Table 4).

DISCUSSION

In this study, we undertook active surveillance of intestinal *P. aeruginosa* colonization in ICU patients over an 18-month period. Overall, 936 rectal swab samples were obtained from 414 patients, of whom 8% were newly colonized by different *P. aeruginosa* phenotypes. There were significant differences in age, prior hospital-

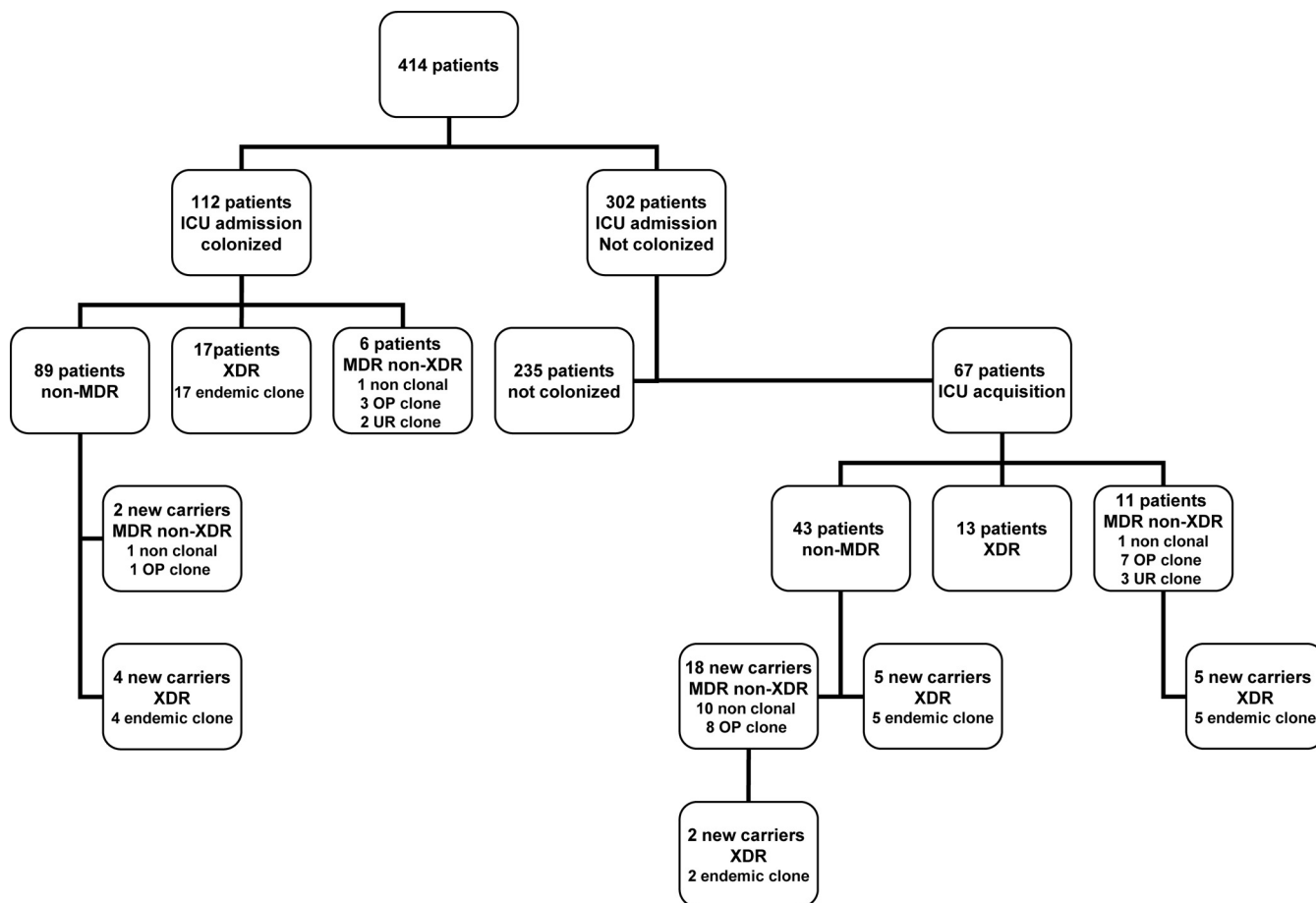


FIG 1 Study schematic diagram of the number of patients: phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* colonization episodes during the 18-month study period. “10 non clonal” refers to the genotype relatedness of 10 MDR-non-XDR isolates and non-MDR isolates. For an explanation of “endemic clone,” see reference 5. UR clone, unrelated clone; OP clone, clone overexpressing MexXY-OprM (17).

ization, and acute illness severity but not prior antibiotic use between colonized and noncolonized patients at ICU admission. Molecular epidemiology research revealed that XDR *P. aeruginosa* phenotypes had identical genotypes, whereas 65% of MDR-non-XDR isolates presented two concomitant clusters. Furthermore, the MLST study showed that the two major MDR clusters belonged to the ST175 and ST111 high-risk clones (5, 17).

We conducted an extensive evaluation of how drug resistance levels differed at the time of intestinal colonization. We found differences in colonization dynamics, with intestinal colonization occurring more prematurely for non-MDR *P. aeruginosa* isolates. Consequently, strains exhibiting high resistance levels for antimicrobials have delayed intestinal colonization due to the time required for selective pressure to facilitate the emergence of new resistant mutants or for preexisting subpopulations of resistant organisms to emerge. In fact, molecular analysis of paired non-MDR and MDR-non-XDR *P. aeruginosa* isolates showed that genetically identical isolates occurred in about 56% of the strains studied, due to the development of resistance in patients exposed to antibiotics. In parallel, antibiotic pressure appeared to provide a selective growth advantage for MDR organisms in the remaining paired isolates (44%), which had different genotypic patterns.

In addition, the observation that similar *P. aeruginosa* geno-

types colonized several ICU patients strongly suggests cross-colonization. The presumed route of colonization in MDR-non-XDR and XDR epidemic strains of *P. aeruginosa* might initially be exogenous and may occur earlier than intestinal colonization. Unfortunately, the only surveillance samples in this study were by rectal swab; no other patient or environmental cultures were performed. Thus, rectal cultures may not be adequate to quantify the initial colonization of patients with clonal strains, despite epidemiological findings, suggesting that patients provide a reservoir for further environmental contamination and cross-transmission (5).

Interestingly, 13% of the patients were not colonized during prolonged ICU stays despite high antimicrobial selection pressures. It is possible that our detection methods for *P. aeruginosa* were insufficiently sensitive, allowing cases of rectal colonization to be missed. However, it is equally plausible that some unknown non-antimicrobial-related host factors may have increased the level of colonization resistance in some patients (18).

We studied antimicrobial use and the extent of exposure before study inclusion. It is important to know the duration of exposure to understand the relationship between antibiotic resistance and microorganisms. The present study provides data concerning the impact of the duration of use of antimicrobials on their ability to

TABLE 2 Descriptive analysis of the phenotype and genotype of the 23 patients with non-MDR and MDR *P. aeruginosa* isolates

Patient no.	Days from ICU admission to		Phenotype/genotype 1	Days of colonization		Phenotype/genotype 2
	colonization 1	Prior antibiotic 1 (days) ^a		2 (days)	Prior antibiotic 2 (days) ^b	
1	5	None	Non-MDR/1	50	APCEF (17), TZP (17)	MDR-non-XDR/1
2	6	NAPEN (2)	Non-MDR/2	29	FQ (2), AG (2), CARB-2 (2), TZP (8)	MDR-non-XDR/2
3	28	NAPEN (13)	Non-MDR/3	28	NAPEN (13)	MDR-non-XDR/3
4	8	NACEF (6)	Non-MDR/4	14	TZP (18)	MDR-non-XDR/4
5	11	None	Non-MDR/5	9	CARB-2 (5), TZP (7), NAPEN (3), GLYC (5)	MDR-non-XDR/5
6	10	CARB-2 (6), TZP (3)	Non-MDR/6	20	CARB-2 (15), CARB-1 (8), CST (9), TZP (6), GLYC (12)	MDR-non-XDR/6
7	12	CARB-2 (10), NAPEN (9)	Non-MDR/7	28	TZP (28), GLYC (5)	MDR-non-XDR/7
8	7	CARB-1 (5)	Non-MDR/8	16	FQ (4), CARB-2 (9), GLYC (9)	MDR-non-XDR/8
9	7	NACEF (5), TZP (2)	Non-MDR/9	5	CARB-2 (5)	MDR-non-XDR/9
10	12	APCEF	Non-MDR/10	6	TZP (6)	MDR-non-XDR/10
11	49	NAPEN (5), TZP (3), GLYC (14)	Non-MDR/11	11	FQ (6), CST (10)	MDR-non-XDR/OP clone
12	8	CARB-2 (1), NACEF (10)	Non-MDR/12	0 ^c	CARB-2 (1), NACEF (10)	MDR-non-XDR/OP clone
13	7	None	Non-MDR/13	8	TZP (10)	MDR-non-XDR/OP clone
14	8	NAPEN (3)	Non-MDR/14	9	AG (4), TZP (8), GLYC (3)	MDR-non-XDR/OP clone
15	6	None	Non-MDR/15	7	FQ (7)	MDR-non-XDR/OP clone
16	9	TZP (2), NAPEN (6)	Non-MDR/16	14	TZP (8), GLYC (14)	MDR-non-XDR/OP clone
17	8	NAPEN (5)	Non-MDR/17	14	FQ (7), APCEF (9)	MDR-non-XDR/OP clone
18	9	CARB-2 (9), GLYC (3)	Non-MDR/18	15	CARB-1 (12), TZP (4)	MDR-non-XDR/OP clone
19	39	NACEF (2), TZP (18), NAPEN (7)	Non-MDR/19	0 ^c	NACEF (2), TZP (18), NAPEN (7)	XDR/endemic clone
20	18	CST (15), TZP (8)	Non-MDR/20	0 ^c	CST (15), TZP (8)	XDR/endemic clone
21	10	CARB-2 (6), TZP (3)	Non-MDR/21	36	AG (15), TZP (16)	XDR/endemic clone
22	8	CARB-1 (5)	Non-MDR/22	16	None	XDR/endemic clone
23	12	FQ (10), TZP (3), NAPEN (8)	Non-MDR/23	5	None	XDR/endemic clone

^a NAPEN, non-antipseudomonal penicillin; NACEF, non-antipseudomonal cephalosporin; CARB-2, group 2 carbapenem; TZP, piperacillin-tazobactam; CARB-1, group 1 carbapenem; APCEF, antipseudomonal cephalosporin; GLYC, glycopeptide; CST, colistin.

^b FQ, fluoroquinolone; AG, aminoglycoside.

^c Non-MDR and MDR isolate in the same sample.

promote digestive tract colonization with MDR *P. aeruginosa* (2, 3). After multivariate analysis, the only agents that remained significantly associated with the MDR *P. aeruginosa* isolation were the fluoroquinolones and the carbapenems (both ertapenem and group 2 carbapenems).

As expected, the underlying disease severity and prior fluoroquinolone and carbapenem consumption were associated with MDR *P. aeruginosa* acquisition. Exposure to group 2 carbapenems and the fluoroquinolones is known to be associated with the development of *P. aeruginosa* infection with wider resistance profiles. Previous studies on digestive colonization in ICU patients have shown that carbapenem exposure was associated with the acquisition of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains, with odds ratios ranging from 3.4 to 7.8 (4, 19). In addition, the ability of fluoroquinolones to promote *P. aeruginosa*-resistant strains was also comparable with that in previous reports (3, 4, 19–21), although a recent study has shown a clear divergence in the role of fluoroquinolones in *P. aeruginosa* resistance (22).

Our study also demonstrated that ertapenem might increase the likelihood of development of polyclonal and clonal MDR *P. aeruginosa* intestinal colonization. There are lingering concerns that extensive ertapenem use may compromise the susceptibility of *P. aeruginosa* to group 2 carbapenems. *P. aeruginosa* is considered to have inherent resistance to ertapenem, and its clinical use was expected to delay the emergence of carbapenem resistance. Previous studies (23, 24) have concluded that, although ertap-

enem can select *in vitro* carbapenem resistance in *P. aeruginosa*, this phenomenon only occurs briefly *in vivo*. In fact, several studies suggest that ertapenem is not associated with increased carbapenem resistance in *P. aeruginosa* (25, 26); however, these reports drew their conclusions from ecological analyses. Other studies have examined the effect of introducing ertapenem into a hospital on the susceptibility of *P. aeruginosa* to group 2 carbapenems (27, 28); in these studies, the authors suspected that the improved susceptibility of *P. aeruginosa* to group 2 carbapenems was related to decreased fluoroquinolone use. However, in line with our finding, a recent patient-centered analysis provided a possible association of ertapenem with the appearance of *P. aeruginosa* resistance patterns (9). This may be explained through collateral damage on the indigenous microflora, with the high capacity of ertapenem to kill significant numbers of normal gastrointestinal flora, promoting an ecological pressure for the spread of MDR *P. aeruginosa*; another possibility is that substantial and prolonged ertapenem use in the past might selectively promote the development of resistance mechanisms in *P. aeruginosa*.

We found a trend toward reduced risks of clonal MDR-non-XDR *P. aeruginosa* versus polyclonal MDR-non-XDR intestinal *P. aeruginosa* colonization with piperacillin-tazobactam. These data suggest that piperacillin-tazobactam was more selection neutral than other agents and may result in the selection of fewer resistant *P. aeruginosa* strains.

There are several limitations in our study. The data set on

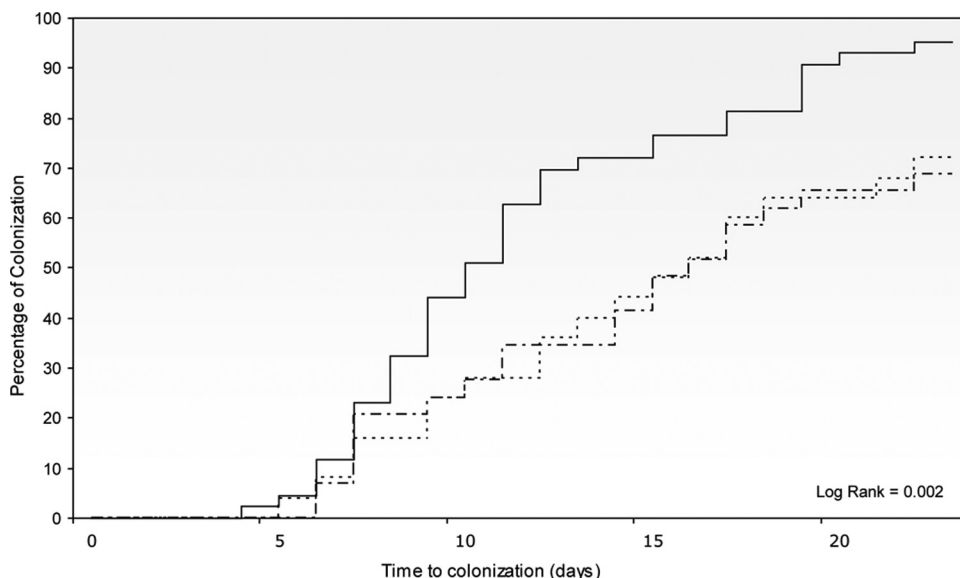


FIG 2 Probability of *Pseudomonas aeruginosa* digestive tract colonization. Solid line, non-MDR *P. aeruginosa* colonization; dotted-dashed line, MDR non-XDR *P. aeruginosa* colonization; dotted line, XDR *P. aeruginosa* colonization.

which we performed our analysis was limited by the small number of patients colonized by different *P. aeruginosa* phenotypes. Although the conclusions are statistically significant, we recommend confirmation of our findings in larger epidemiological studies. In addition, restricting screening to stool samples might have resulted in an underestimation of early colonization with clonal MDR *P. aeruginosa* strains. For example, the possibility that clonal MDR *P. aeruginosa* strains were already present at other gut sites cannot be excluded. Future studies that include multiple screening sites might help. Finally, the results may have been influenced by local epidemiological variables not applicable in other settings, including a relatively high rate of horizontal transmission and almost universal antibiotic exposure. On balance, we believe that

this was a useful approach for the epidemiological evaluation of MDR *P. aeruginosa* and even XDR *P. aeruginosa* strains.

In conclusion, our study contributes to a better understanding of the dynamics of endogenous *P. aeruginosa* colonization. The molecular data alerted us to the fact that different clusters of MDR *P. aeruginosa* coexist in our ICU, although few of those evolve in the same patient. Additionally, the risk of patients acquiring MDR *P. aeruginosa* colonization varied between antibiotic classes; group 2 carbapenems and fluoroquinolones had established associations, while ertapenem may also have contributed to promoting MDR *P. aeruginosa* strains. On the other hand, piperacillin-tazobactam appeared to be less selective for the development of MDR *P. aeruginosa* strains. It is possible that use of such a very

TABLE 3 Cox regression analysis of risk factors for MDR *P. aeruginosa* intestinal colonization in ICU patients: impact of exposure to antibiotic therapy

Characteristic	Results for crude analysis:		Results for adjusted analysis:	
	cHR ^a (95% CI)	P	aHR (95% CI)	P
Age > 65 yr	1.11 (0.72–1.73)	0.63	1.38 (0.86–2.19)	0.17
Male gender	1.20 (0.94–1.52)	0.13	1.20 (0.94–1.54)	0.14
SAPS score at ICU admission (>40)	1.53 (0.79–2.37)	0.054	1.26 (0.79–2.02)	0.32
Charlson index of ≥ 3	1.96 (1.26–3.04)	0.003	1.97 (1.22–3.18)	0.006
Prior hospital stay	1.15 (0.75–1.78)	0.52		
Prior fluoroquinolones ^b	1.02 (1.00–1.04)	0.013	1.02 (1.00–1.04)	0.039
Prior aminoglycosides ^b	1.02 (0.94–1.12)	0.59		
Prior carbapenems ^b	1.04 (1.01–1.07)	0.007	1.03 (1.00–1.07)	0.041
Prior ertapenem ^b	1.08 (1.03–1.14)	0.002	1.08 (1.02–1.14)	0.004
Prior colistin ^b	1.03 (0.99–1.07)	0.11	1.03 (0.99–1.08)	0.12
Prior antipseudomonal cephalosporins ^b	1.01 (0.98–1.05)	0.37		
Prior other cephalosporins ^b	1.00 (0.98–1.03)	0.58		
Prior piperacillin-tazobactam ^b	0.98 (0.94–1.00)	0.13	0.98 (0.95–1.01)	0.29
Prior penicillin ^b	1.00 (0.99–1.02)	0.65		
Prior glycopeptides ^b	0.99 (0.97–1.01)	0.53		

^a cHR, crude hazard ratio.

^b Antibiotics per day.

TABLE 4 Cox regression analysis of risk factors for clonal MDR-non-XDR *P. aeruginosa* intestinal colonization in ICU patients: impact of exposure to antibiotic therapy

Characteristic	Results for crude analysis		Results for adjusted analysis	
	cHR ^a (95% CI)	P	aHR (95% CI)	P
Age > 65 yr	0.77 (0.33–1.80)	0.55	1.20 (0.47–3.04)	0.69
Male gender	1.90 (0.74–4.87)	0.18	0.43 (0.12–1.53)	0.19
SAPS score at ICU admission (>40)	1.23 (0.53–2.87)	0.62		
Charlson index of ≥3	2.48 (1.01–6.11)	0.047	2.05 (0.76–5.52)	0.15
Prior hospital stay	0.75 (0.33–1.68)	0.48		
Prior non-MDR colonization	0.43 (0.17–1.09)	0.076	0.61 (0.21–1.75)	0.36
Prior fluoroquinolones ^b	1.05 (0.960–1.16)	0.23		
Prior aminoglycosides ^b	1.14 (0.79–1.64)	0.46		
Prior carbapenems ^b	0.94 (0.84–1.04)	0.23		
Prior ertapenem ^b	1.07 (1.00–1.15)	0.048	1.10 (1.01–1.19)	0.026
Prior colistin ^b	0.96 (0.88–1.03)	0.24		
Prior antipseudomonal cephalosporins ^b	0.96 (0.88–1.05)	0.38		
Prior other cephalosporins ^b	0.99 (0.97–1.02)	0.95		
Prior piperacillin-tazobactam ^b	0.92 (0.86–0.98)	0.024	0.95 (0.88–1.02)	0.19
Prior penicillins ^b	1.27 (0.57–2.84)	0.56		
Prior glycopeptides ^b	0.96 (0.89–1.03)	0.23		

^a cHR, crude hazard ratio.^b Antibiotics per day.

broad-spectrum antibiotic might offer a valuable strategy to minimize the spread of MDR *P. aeruginosa* strains.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by National Health Service grant FIS 11/00164 from the Fondo de Investigación Sanitarias Instituto de Salud Carlos III and by the Ciber de Enfermedades Respiratorias (CB06/06/0037).

REFERENCES

- Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. 1999. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**:1212–1219. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.160.4.9809031>.
- Philippe E, Weiss M, Schultz JM, Yeomans F, Ehrenkraz NJ. 1999. Emergence on highly antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* in relation to duration of empirical antipseudomonal antibiotic treatment. *Clin. Perform. Qual. Health Care* **7**:83–87.
- Paramythiotou E, Lucet JC, Timsit JF, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Trouillet JL, Belloc S, Kassis N, Karabinis A, Andreumont A. 2004. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin. Infect. Dis.* **38**:670–677. <http://dx.doi.org/10.1086/381550>.
- Peña C, Guzmán A, Suarez C, Dominguez MA, Tubau F, Pujol M, Gudiol F, Ariza J. 2007. Effects of carbapenem exposure on the risk for digestive tract carriage of intensive care unit endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain in critically ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1967–1971. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01483-06>.
- Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, Gavalda L, Sora M, Oliver A, Pujol M, Ariza J. 2011. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. *BMC Infect. Dis.* **11**:272–279. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-11-272>.
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodriguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2012. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:6349–6357. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01388-12>.
- Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Zamorano L, Juan C, Tubau F, Rodriguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2013. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:5527–5535. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01481-13>.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahimeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**:268–281. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- Cohen MJ, Block CS, Moses AE, Nir-Paz R. 2014. Exposure to ertapenem is possibly associated with *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**:O188–O196. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12362>.
- Le Gall JR, Loirat P, Alperovitch A, Glaser P, Granthil C, Mathieu D, Mercier P, Thomas R, Villers D. 1984. A simplified acute physiologic score for ICU patients. *Crit. Care Med.* **12**:975–977. <http://dx.doi.org/10.1097/00003246-198411000-00012>.
- Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. 1987. A new method of classifying prognostic co-morbidity in longitudinal studies: development and validation. *J. Chron. Dis.* **40**:373–383. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, Nordmann P, Vincent JL, Struelens MJ. 2005. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1198–1204. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.3.1198-1204.2005>.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233–2239.
- Curran B, Jonas D, Grudmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5644–5649. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>.
- Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. 2004. mlstDBNet-distributed multilocus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* **5**:86. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-5-86>.
- Peña C, Suarez C, Tubau F, Juan C, Moyà B, Dominguez MMA, Oliver A, Pujol M, Ariza J. 2009. Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1 β-lacta-

- mase. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2381–2387. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00094-09>.
18. Vollaard EJ, Clasener HAL. 1994. Colonization resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:409–414. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.38.3.409>.
 19. Lepelletier D, Cady A, Caroff N, Marraillac J, Reynaud A, Lucet JC, Corvec S. 2010. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal carriage among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**:1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.08.014>.
 20. Cao B, Wang H, Sun H, Zhu Y, Chen M. 2004. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hosp. Infect.* **57**:112–118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2004.03.021>.
 21. Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N, Gouby A, Mahamat A, Daurès JP, Sotto A. 2004. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *J. Hosp. Infect.* **57**:209–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2004.03.022>.
 22. Martínez JA, Delgado E, Martí S, Marco F, Vila J, Mensa J, Torres A, Codina C, Trilla A, Soriano A, Alquezar A, Castro P, Nicolás JM. 2009. Influence of antipseudomonal agents on *Pseudomonas aeruginosa* colonization and acquisition of resistance in critically ill medical patients. *Intensive Care Med.* **35**:439–447. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-008-1326-y>.
 23. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M. 2005. Selectivity of ertapenem for *Pseudomonas aeruginosa* mutants cross-resistant to other carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:306–311. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki009>.
 24. Vainio S, Wilhelm A, Vandenbroucke-Grauls C, Murk JL, Debets-Ossenkopp Y. 2013. Rapid selection of carbapenem-resistant by clinical concentrations of ertapenem. *Int. J. Antimicrob. Agents* **41**:492–494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.01.010>.
 25. Carmeli Y, Lidji SK, Shabtai E, Navon-Venezia S, Schwaber MJ. 2011. The effects of group 1 versus group 2 carbapenems on imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an ecological study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **70**:367–372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.009>.
 26. Nicolau DP, Carmeli Y, Crank CW, Goff DA, Graber CJ, Lima AL, Goldstein EJC. 2012. Carbapenem stewardship: does ertapenem affect *Pseudomonas* susceptibility to other carbapenems? A review of the evidence. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**:11–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.08.018>.
 27. Cook PP, Gooch M, Rizzo S. 2011. Reduction in fluoroquinolones use following introduction of ertapenem into a hospital formulary is associated with improvement in susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to group 2 carbapenems: a 10-year study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:5597–5601. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00742-11>.
 28. Sousa D, Castelo-Corral L, Gutiérrez-Urbón JM, Molina F, López-Calviño B, Bou G, Linares P. 2013. Impact of ertapenem use on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* imipenem susceptibility rates: collateral damage or positive effect on hospital ecology? *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:1917–1925. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt091>.

Prospective Observational Study of Prior Rectal Colonization Status as a Predictor for Subsequent Development of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Infections

Silvia Gómez-Zorrilla,^a Mariana Camoez,^b Fe Tubau,^b Rosario Cañizares,^c Elisabet Periche,^c M. Angeles Dominguez,^b Javier Ariza,^a Carmen Peña^a

Infectious Diseases Service,^a Microbiology Service,^b and Intensive Care Service,^c Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Barcelona, Spain

The potential role of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) intestinal colonization in the subsequent development of infections has not been thoroughly investigated. The aims of this study were to assess the role of PA intestinal colonization as a predictor of subsequent infections and to investigate the risk factors associated with the development of PA infection in patients in the intensive care unit (ICU). For this purpose, a prospective study was conducted that included (i) active surveillance of PA rectal colonization at ICU admission and weekly until ICU discharge, (ii) detection of PA clinical infections, and (iii) genotypic analysis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). A total of 414 patients were included, of whom 179 (43%) were colonized with PA. Among the 77 patients who developed PA infection, 69 (90%) had prior PA colonization, and 60 (87%) of these showed genotypic concordance between rectal and clinical isolates. The probability of PA infection 14 days after ICU admission was 26% for carriers versus 5% for noncarriers ($P < 0.001$). Cox regression analysis identified prior PA rectal colonization as the main predictor of PA infection (hazard ratio [HR], 15.23; 95% confidence interval [CI], 6.9 to 33.7; $P < 0.001$). Prior use of nonantipseudomonal penicillins was also identified as an independent variable associated with PA infection (HR, 2.15; 95% CI, 1.3 to 3.55; $P < 0.003$). Our study demonstrated that prior PA rectal colonization is a key factor for developing PA infection.

Pseudomonas aeruginosa (PA) is a Gram-negative bacterium that is one of the most common nosocomial pathogens, causing severe infections with significant morbidity and mortality (1). PA has an intrinsic resistance to a wide range of antibiotics and a notable ability to acquire resistance during the course of antibiotic therapy, resulting in the development of multidrug-resistant strains (2). In recent decades, the incidence of infections caused by multidrug-resistant bacteria has continuously increased. This problem is of major concern due to the emergence of strains resistant to almost all of the available antimicrobial drugs (3).

Despite the growing number of antibiotic-resistant infections, the clinical consequences of multidrug resistance are still unclear. Experimental studies suggest a possible association between acquisition of resistance mechanisms and a fitness cost, which decreases the virulence of PA (4–6). Nevertheless, other researchers propose that resistant bacteria may develop additional compensatory mechanisms that can compensate for the fitness cost caused by resistant mutations (7, 8). The current data on the correlation between the resistance pattern of PA and clinical pathogenicity are limited. In an earlier study, our group determined the invasive capacity of PA by analyzing its ability to produce bloodstream infections (9). However, that study had some limitations, such as its retrospective design and the fact that no active surveillance was performed to detect PA colonization.

Intestinal colonization is believed to play an essential role in the pathogenesis of PA infection in patients in the intensive care unit (ICU) (10–14). Although it is widely assumed that colonization precedes the development of infection, little is known about its relative importance in this process. A few descriptive studies have been conducted to assess the issue (14–16); however, the design of these studies did not allow for an assessment of the

temporal relationship. Genotype studies are needed to establish a causal link between surveillance strains and clinical samples.

We therefore conducted a prospective active surveillance program in ICU patients to investigate the role of PA rectal colonization as a predictor of subsequent PA infection to determine whether there are differences in the ability to develop infection based on the presence of PA on rectal surveillance cultures. We also investigated the potential influence of other variables on the development of PA infection in order to identify modifying risk factors associated with these infections.

(This paper was presented in part at the 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, 5 to 9 September 2014 [17].)

MATERIALS AND METHODS

Setting. This study was performed in one of the three general ICU units at the Hospital Universitari de Bellvitge, a 700-bed tertiary-care institution for adult patients in Barcelona. The ICU is a 12-bed, private-room ward

Received 27 October 2014 Returned for modification 17 December 2014

Accepted 6 June 2015

Accepted manuscript posted online 15 June 2015

Citation Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Cañizares R, Periche E, Dominguez MA, Ariza J, Peña C. 2015. Prospective observational study of prior rectal colonization status as a predictor for subsequent development of *Pseudomonas aeruginosa* clinical infections. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5213–5219. doi:10.1128/AAC.04636-14.

Address correspondence to Carmen Peña, cpena@bellvitgehospital.cat.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.04636-14

providing care to medical and surgical patients, including those who have undergone solid-organ transplantation.

Study design and data collection. This prospective cohort study included all patients admitted to the ICU for >48 h during an 18-month period (1 January 2012 to 1 July 2013). The study design was approved by the Clinical Ethics Committee of the Hospital Universitari de Bellvitge, and patients or family provided written informed consent.

An active surveillance study was performed by obtaining rectal swab samples on ICU admission and weekly until ICU discharge in order to identify digestive tract colonization of PA. Patients were followed from ICU admission to ICU discharge in order to detect invasiveness (defined as the ability to develop infection in carriers) and to determine patients' outcomes. Clinical samples were collected as requested by medical staff.

Definitions. Demographic and clinical characteristics of each patient were collected prospectively. Sex, age, length of hospitalization before ICU admission, underlying diseases, and the Charlson comorbidity index as an indicator of patient comorbidity were recorded on admission (18). Patients were considered to have cancer when malignancy was diagnosed in the last 5 years or if they were receiving oncological therapy. They were considered to be immunosuppressed if chemotherapy, radiotherapy, corticosteroids, or other immunosuppressive agents were administered in the 3 months prior to the ICU admission. Prior surgery was defined as the presence of surgical events within 3 months prior to ICU admission. The Simplified Acute Physiologic Score (SAPS II) was used to estimate patients' disease severity at ICU admission (19). Prior hospital stay was defined as hospitalization in the last 3 months or hospital stay of >48 h before ICU admission. The source of infection was established according to the Centers for Disease Control and Prevention criteria (20). Ventilator-associated pneumonia (VAP) was defined as pneumonia that developed after the patient underwent intubation and received mechanical ventilation for at least 48 h. Ventilator-associated tracheobronchitis (VAT) is a clinical syndrome similar to VAP but with no radiographic infiltrate present (21); VAP and VAT were classified according to the clinical pulmonary infection score (CPIS). The diagnosis of VAP was made in the case of a CPIS of ≥ 6 , while the diagnosis of VAT was made when the score was < 6 , requiring also the presence of clinical signs and symptoms (e.g., fever, purulent appearance of respiratory secretions, elevated leukocyte count) and microbiological criteria (i.e., growth of pathogens on a lower respiratory tract culture) (22). Ascertainment of the clinical infection was performed by the study investigators according to CDC definitions and CPIS score in cases of VAP/VAT.

Exposure to antibiotics was determined as the number of days of antibiotic treatment in the 3 months prior to the ICU admission and was recorded according to antibiotic family: fluoroquinolones, carbapenems, aminoglycosides, antipseudomonal, and nonantipseudomonal cephalosporins, and antipseudomonal and nonantipseudomonal penicillins. Data on other antibiotic families (colistin, glycopeptides, monobactam, and fosfomicin) were also collected, but no statistical analysis was performed because the mean length of exposure was very short (< 1.5 days) and therefore of low relevance.

PA phenotypes were classified according to their pattern of antimicrobial resistance (23). Multidrug-resistant PA (MDR-PA) was defined as a strain nonsusceptible to at least one agent in three or more antipseudomonal antimicrobial categories. Extensively drug-resistant PA (XDR-PA) was defined as a strain nonsusceptible to at least one agent in all but two or fewer antipseudomonal antimicrobial categories. Therefore, XDR-PA strains were also included as MDR-PA. Non-multidrug-resistant PA (non-MDR-PA) was defined as a wild-type strain or a strain nonsusceptible to at least one agent in fewer than three antipseudomonal antimicrobial categories.

Microbiological studies. PA strains were identified and tested for antimicrobial susceptibility by a MicroScan automated microdilution system using CN1S and CO1S panels (Dade International, West Sacramento, CA, USA). CLSI criteria were used to define susceptibility or resistance to these antimicrobial agents (24). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

analysis using a method described previously was performed to identify any relationship between the strain isolated in the rectal swab and the subsequent clinical sample from the source of infection (25). We performed PFGE analysis of 69 pairs of PA strains isolated from the same patient: 42 samples of non-MDR, 12 pairs of MDR non-XDR, and 15 pairs of XDR. DNA restriction patterns generated by PFGE were interpreted according to the guidelines (26).

Statistical analysis. Comparative analyses of baseline characteristics of the groups based on results of surveillance culture were performed with the Student *t* test or the Mann-Whitney *U* test for continuous variables and the χ^2 or Fisher's exact test for categorical variables, as appropriate (Table 1). Continuous variables are expressed as means (standard deviation) or medians (interquartile range), depending on the distribution.

The Kaplan-Meier method was used to investigate the role of PA rectal colonization in subsequent infections. Only single patients were included. PA clinical infection was considered the main event. Time zero was the date of ICU admission, and patients were censored when they were discharged from the ICU or when they died for reasons other than infection. The risk to develop clinical infections due to PA is different before and after a prior rectal colonization. Therefore, positive surveillance culture was treated as a time-dependent variable to deal with the difference in risk. The time-dependent covariate was created using the date of the first positive surveillance culture. Univariate and multivariate analyses of parameters predicting PA infection were made with Cox regression analysis (Table 2). Variables that were associated with infection and had a *P* value of < 0.10 in the crude analyses were included in the adjusted analysis. To compare the ability to develop infection according to the profile of resistance, we included only the first episode of infection. If colonization was demonstrated after infection, or if no rectal colonization was identified during the follow-up, the episode of infection was not analyzed (Fig. 1).

The impact of prior antimicrobial therapy was evaluated when comparing the rectal colonization status of the patients (Table 1). To do that, data on antibiotic exposure were collected from 3 months prior to ICU admission until the day that surveillance culture become positive in colonized patients or the day of discharge or death in noncolonized patients. In regard to analyses conducted to identify parameters associated with PA clinical infection (Table 2), antibiotic exposure was measured until the day of the infection for infected patients and until the day patients were censored (discharge or death) if infection did not occur. Antibiotic exposure was analyzed as a binary variable and was recorded according to antibiotic classes. Data were analyzed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 19.0 and R version 3.1.2 software. A *P* value of < 0.05 indicated statistical significance.

RESULTS

Epidemiological and clinical characteristics. A total of 414 patients were included in the study, of whom 179 (43%) were colonized with PA. Information describing the study sample was reported elsewhere (27).

During the study, 97 episodes of PA infection occurred in 77 patients: 14 patients presented two episodes of PA infection, and three patients presented three episodes. The overall incidence of PA infection in ICU patients during the study was 19% (77/414). Clinical and epidemiological characteristics of the patients included in the study are shown in Table 1. Among the 77 first episodes of infection, 45 (58%) were caused by non-MDR-PA, 12 (16%) by MDR non-XDR strains, and 20 (26%) by XDR-PA. The source of the infection in non-MDR-PA infections was respiratory in 34 patients (76%), intravascular catheter-related bacteremia in 3 (7%), intra-abdominal in 2 (4%), osteoarticular in 1 (2%), and other sources in 5 (11%), 1 of whom had bacteremia. The source of MDR non-XDR infection was respiratory in 10 (84%) patients (2 with bloodstream infection), intravascular catheter-related bacteremia in 1 (8%), and intra-abdominal in 1 (8%). The origin

TABLE 1 Clinical and epidemiological characteristics of patients based on results of surveillance culture

Variable	No. of PA ^a rectal colonized patients (%) (n = 179)	No. of PA noncolonized patients (%) (n = 235)	P value
Baseline characteristics			
Age (yr, median [interquartile range])	66.8 (56.4–75.3)	64.3 (51.2–73.1)	0.06
Sex, male	126 (70)	139 (59)	0.013
Charlson index score (median [interquartile range])	2 (1–4)	2 (1–4)	0.76
SAPS II score at ICU admission (median [interquartile range])	44 (36–52)	43 (34–51)	0.46
Main underlying disease			
Diabetes	43 (24)	65 (28)	0.50
Chronic pulmonary disease	47 (26)	47 (20)	0.13
Cardiovascular disease	75 (42)	75 (32)	0.04
End-stage renal failure	24 (13)	30 (13)	0.88
Chronic liver disease	24 (13)	30 (13)	0.88
Vascular/degenerative brain disease	25 (9)	20 (14)	0.08
Malignant disease	34 (19)	55 (23)	0.34
Immunosuppressed	44 (25)	63 (27)	0.73
Prior hospital stay	132 (73)	96 (41)	<0.001
Prior surgery	107 (60)	125 (53)	0.16
Hospital mortality	54 (30)	65 (28)	0.58
Prior antibiotic use (days, median [interquartile range])			
Fluoroquinolones	7 (2–14)	8 (0–16)	0.95
Carbapenems	35 (20)	41 (17)	0.61
Antipseudomonal penicillins	46 (26)	60 (26)	1
Nonantipseudomonal penicillins	68 (38)	70 (30)	0.07
Antipseudomonal cephalosporins	65 (36)	57 (24)	0.007
Nonantipseudomonal cephalosporins	16 (8)	16 (7)	0.46
Aminoglycosides	20 (11)	22 (9)	0.62
Other	5 (3)	6 (3)	0.93
Source of PA clinical infection			
Respiratory ^b	71 (92)	6 (8)	<0.001
VAP	53 (69)	3 (4)	
VAT	38 (49)	1 (1)	
Urinary	15 (20)	2 (3)	
Catheter	2 (3)	0 (0)	
Intra-abdominal	6 (8)	2 (3)	
Osteoarticular	3 (4)	1 (1)	
Unknown/endogenous	1 (1)	0 (0)	
Other	1 (1)	0 (0)	
Other	5 (6)	0 (0)	

^a PA, *Pseudomonas aeruginosa*.

^b VAP, ventilator-associated pneumonia; VAT, ventilator-associated tracheobronchitis.

of XDR-PA infection was respiratory in 12 (60%) patients (1 with bacteremia), intravascular catheter-related bacteremia in 4 (20%), urinary-source bacteremia in 2 (10%), intra-abdominal in 1 (5%), and unknown-source bacteremia in 1 (5%). XDR and other PA phenotype strains differed significantly in regard to the source of infection, with XDR-PA infection presenting a higher percentage with a vascular or urinary catheter focus (6 patients [30%] in XDR-PA versus 4 patients [7%] in non-XDR-PA; $P = 0.016$).

Phenotypic and genotypic analysis. Among the 69 pairs of PA strains with subsequent infection, 60 (87%) showed concordance between rectal and clinical isolates: 39/42 (93%) in non-MDR infections, 8/12 (67%) in MDR non-XDR infections, and 13/15 (87%) in XDR infections. The genotypic analysis confirmed a clonal dissemination in XDR-PA strains, which was due to a cluster belonging to the high-risk clone ST175.

Risk factors for PA infection. Among the 77 patients who developed PA infection, 69 (90%) presented with prior PA intestinal colonization, while 8 (10%) did not (5 patients with no coloniza-

tion during admission and 3 with rectal colonization identified after PA infection) (Fig. 1). The proportion of infection was 39% in colonized patients and 3.4% in noncolonized patients ($P < 0.001$).

The unadjusted probabilities of PA infection in PA-colonized patients are shown in Fig. 2. The probability of PA infection at 14 days after ICU admission was 26% for PA-colonized patients versus 5% for noncolonized patients (log rank, $P < 0.001$). Baseline characteristics and variables examined as possible predictors of PA clinical infection are displayed in Table 2. After adjusting for Charlson index, chronic liver disease, prior PA rectal colonization, and prior consumption of fluoroquinolones, antipseudomonal penicillins, nonantipseudomonal penicillins, and nonantipseudomonal cephalosporins, a Cox regression model showed prior PA intestinal colonization to be the main factor associated with development of PA infection (hazard ratio [HR], 15.23; 95% confidence interval [CI], 6.9 to 33.7; $P < 0.001$).

Sixty first episodes of infection were included (39 non-MDR, 8 MDR non-XDR, and 13 XDR) (Fig. 1). Due to the existence of a

TABLE 2 Cox regression analysis of predictive factors for the development of clinical infections due to *P. aeruginosa*

Variable ^a	No. with clinical PA infection (%) (n = 77)	No. with nonclinical PA infection (%) (n = 337)	Crude analysis		Adjusted analysis	
			HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
Baseline feature						
Age >65 yr	40 (52)	175 (52)	1.02 (0.65–1.62)	0.92		
Male	57 (74)	208 (62)	0.88 (0.68–1.13)	0.31		
Charlson score >2	40 (52)	151 (45)	1.49 (0.95–2.34)	0.08	1.18 (0.7–2.01)	0.531
SAPS II >40 score at ICU admission	45 (58)	195 (58)	1.01 (0.63–1.59)	0.98		
Main underlying disease						
Diabetes	14 (18)	94 (28)	0.85 (0.47–1.52)	0.58		
Chronic pulmonary disease	17 (22)	77 (23)	1.05 (0.61–1.80)	0.86		
Cardiovascular disease	26 (34)	124 (37)	1.02 (0.63–1.63)	0.95		
End-stage renal failure	7 (9)	47 (14)	0.93 (0.43–2.05)	0.86		
Chronic liver disease	14 (18)	40 (12)	1.81 (1.01–3.24)	0.046	1.52 (0.77–3.01)	0.228
Vascular/degenerative brain disease	11 (14)	34 (10)	0.95 (0.50–4.82)	0.89		
Malignant disease	17 (22)	72 (21)	0.87 (0.50–1.53)	0.64		
Immunosuppressed	21 (27)	86 (26)	0.78 (0.56–1.55)	0.78		
Prior hospital stay	72 (94)	156 (46)	10.1 (4.08–25)	<0.001		
Prior surgery	49 (64)	182 (54)	1.28 (0.80–2.06)	0.29		
Hospital mortality	26 (34)	93 (28)	1.41 (0.87–2.28)	0.16		
Prior rectal colonization	69 (90)	107 (32)	16.57 (7.53–36.49)	<0.001	15.23 (6.9–33.7)	<0.001
Prior antibiotic use >10 days						
Fluoroquinolones	41 (53)	155 (41)	1.33 (0.80–2.12)	0.27		
Carbapenems	12 (16)	74 (22)	0.42 (0.22–0.78)	0.006	0.40 (0.21–0.76)	0.005
Antipseudomonal penicillins	25 (32)	96 (28)	0.76 (0.48–1.26)	0.30		
Nonantipseudomonal penicillins	29 (38)	128 (38)	0.33 (0.20–0.54)	<0.001	0.39 (0.23–0.64)	<0.001
Antipseudomonal cephalosporins	34 (44)	88 (26)	1.71 (1.08–2.70)	0.022	2.15 (1.3–3.55)	0.003
Nonantipseudomonal cephalosporins	11 (15)	25 (7)	1.35 (0.71–2.57)	0.36		
Aminoglycosides	17 (22)	31 (9)	1.88 (1.08–3.27)	0.026	1.05 (0.58–1.9)	0.865
	3 (4)	8 (2)	1.01 (0.32–3.22)	0.99		

^a For the multivariate analyses, variables with a *P* value of <0.10 in the univariate analyses were included. To avoid colinearity problems, the final model does not include the prior hospital stay variable as it is nearly predicted by the prior colonization variable. Differential risks for development of prior rectal colonization were accounted for using a time-dependent variable within the model. Abbreviations: PA, *Pseudomonas aeruginosa*; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

clonal dissemination in XDR-PA strains and the different behavior of this cluster, we only analyzed differences in the ability to produce infection in polyclonal strains. The probability of infection at 14 days of colonization was 26% for non-MDR versus 16% for MDR non-XDR (log rank, *P* = 0.13). After adjusting to avoid potential confounding factors in a multivariate analysis, a trend toward an increased risk of infection in non-MDR-PA intestinal carriers was observed (HR, 1.75; 95% CI, 0.81 to 3.8; *P* = 0.15).

DISCUSSION

We designed a prospective study of a 1.5-year cohort of patients admitted to a medical and surgical ICU in order to investigate whether PA intestinal colonization contributes to the development of PA infection acquired in the ICU. Our study demonstrated a significant association between PA-colonized patients and the development of PA infection, as evidenced by the fact that the risk of developing PA clinical infections among PA-colonized patients was 15 times higher than the risk found in noncolonized patients (HR, 15.23; 95% CI, 6.9 to 33.7; *P* < 0.001).

PA has a remarkable ability to colonize and infect patients. Classic epidemiological analysis suggests that there are two major routes of colonization: endogenous and exogenous (10, 11, 13). Intestinal colonization is considered the most important endogenous source preceding the development of PA infection. In these cases, PA infections are polyclonal and caused by the patient's own flora after PA pathological colonization of endogenous reservoirs

(10, 13, 14). Additionally, exogenous routes have been demonstrated to play an essential role in the pathogenesis of PA infection, mainly in outbreak situations (13). In the exogenous colonization, patients may become colonized from contaminated reservoirs or other colonized patients (cross-colonization) (13, 14).

Previous studies of digestive colonization have shown that patients who are colonized are significantly more likely to have episodes of invasive infection than patients who are not. The average rate of infection in colonized patients ranges from 15% to 90%. This discrepancy in the rate of invasive infection in the few studies published may be due in part to the patients' conditions and the methodology applied (10, 14, 16). The sample size in one of these studies was very small, and the correlation between rectal colonization and development of infection was not definitive, since neither serial intestinal tract cultures nor genotypic studies were performed (14).

Thus, to evaluate the association between colonization and infection, we conducted a weekly active surveillance of intestinal tract PA colonization to establish the temporal relation, and we did a molecular study of the strains to define the genetic relatedness of surveillance and clinical samples. Depending on the presence or absence of prior rectal colonization, differences in the ability to develop PA infection were found. In the multivariate model, previous PA intestinal colonization was the main risk factor for the development of PA infection.

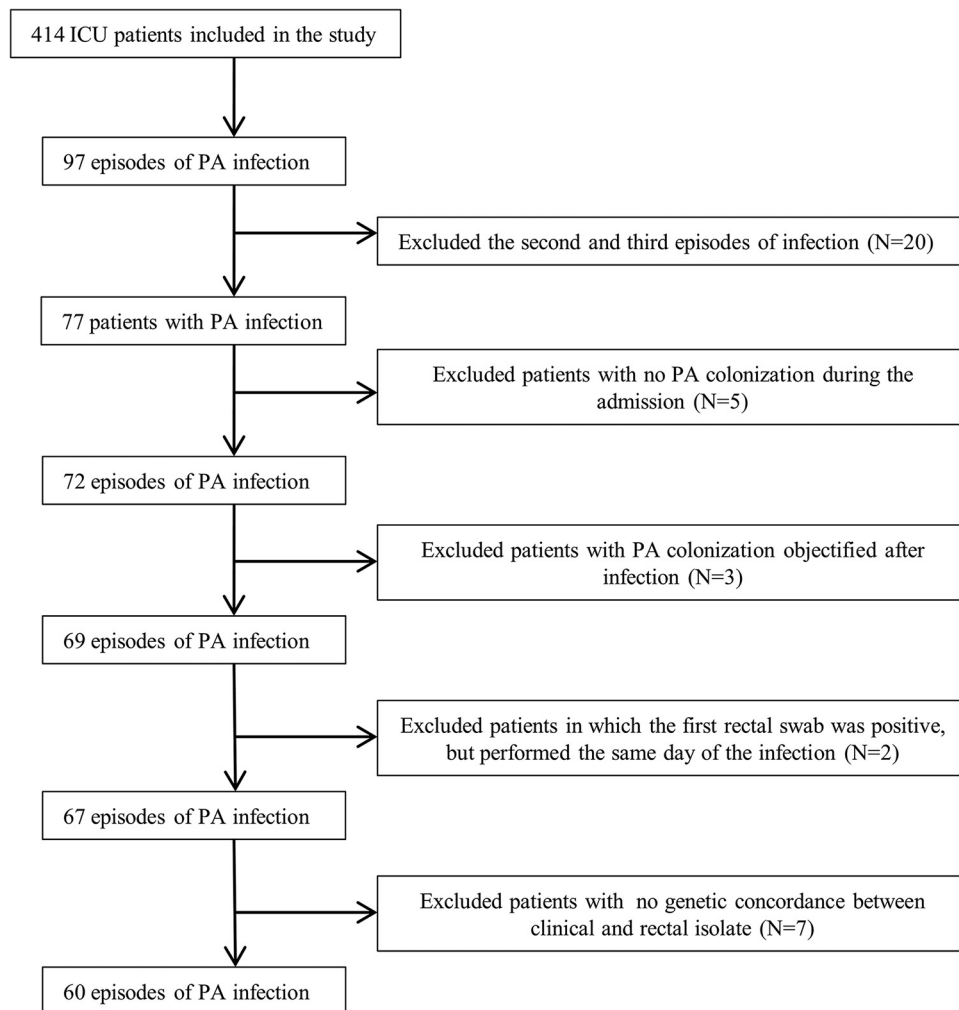


FIG 1 Flow diagram of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) clinical infection selection process, indicating episode.

A retrospective cohort study was done in an ICU where surveillance for detecting Gram-negative bacteria was performed routinely. Researchers found that 74.5% of bacteremia incidences were preceded by colonization, and they were associated with higher rates of appropriate therapy than those occurring in noncolonized patients (12). In line with our findings, a recent retrospective cohort study showed that the presence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* on surveillance cultures was strongly associated with the development of carbapenem-resistant *A. baumannii* infections (28). Our study supports these data, as the genotype study revealed an 87% concordance between surveillance and clinical samples. These molecular data, together with the greater ability to develop infection in patients previously colonized with PA (39%), strongly suggest that PA intestinal colonization is a key requirement for developing PA infection in ICU patients. Moreover, knowledge of PA colonization may help to initiate appropriate empirical therapy and may make it possible to restrict the use of the limited number of drugs available for treating MDR-PA infections (colistin or amikacin) to a select group of patients, thus avoiding the deleterious effect of these drugs in patients not receiving these drugs.

Interestingly, the molecular analysis study of pairs did not co-

incide in three patients with surveillance and clinical samples presenting non-MDR-PA strains. We cannot dismiss the possibility that multiple genotypes of non-MDR-PA strains were present in rectal samples and were not detected due to the impossibility of isolating all strains with a similar phenotype. This difficulty may also have appeared in the six noncoincident pairs of MDR phenotypes. This underlines the complexity of the clinical epidemiology of PA and the difficulty in drawing conclusions regarding epidemiological causality without molecular studies.

Molecular analysis demonstrated the existence of a clonal dissemination in XDR PA strains, which was responsible for an endemic outbreak in our hospital that was previously described (29). The epidemic nature of the XDR-PA cluster may explain differences in the sources of infection, the most common in XDR-PA infection being the vascular and urinary catheter focused, which are associated with a relatively high rate of manipulation and subsequent horizontal transmission. When we compared the ability of polyclonal non-MDR and polyclonal MDR strains to develop infection, we found a trend toward an increased risk of infection in patients colonized by non-MDR-PA strains, which may suggest that non-MDR strains are more pathogenic. However, these differences are not significant, probably due to the small sample size,

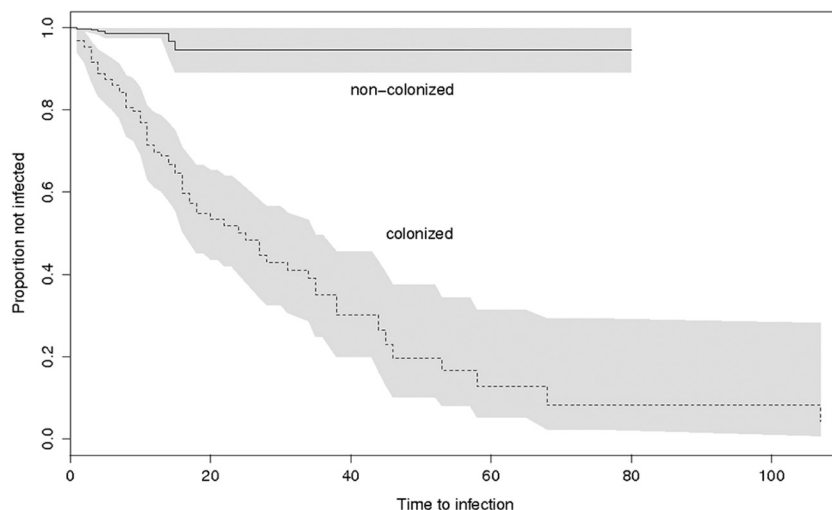


FIG 2 Survival curves showing the probability of developing *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infection based on rectal colonization status. The start of the risk period was defined as the ICU admission. Solid line, noncolonized patients; dashed line, PA-colonized patients. The areas of 95% confidence intervals of both groups are shown.

and large future studies are needed to confirm the interplay between antibiotic resistance and pathogenicity in the clinical setting.

Finally, previous studies assessed the influence of antimicrobial use in PA intestinal colonization (27). However, little is known about the role of antibiotic therapy in the development of invasive PA infection. In our study, nonantipseudomonal penicillins were associated with PA infection. PA is a microorganism with inherent resistance to these antibiotic classes, and their consumption in PA-colonized patients may lead to selection of PA, thus causing collateral damage to the endogenous microflora (10, 14, 16). While, overall, antibiotics play a decisive role in selecting intestinal flora, fluoroquinolones and antipseudomonal penicillins can preserve activity against a significant number of PA strains and thus protect against the development of PA infections.

The current study is the largest prospective analysis of the role of PA intestinal colonization in subsequent infection. However, several limitations should be mentioned. Despite being a large cohort, the data set in which we performed our analysis of invasiveness according to the resistance profile of PA was limited by the small number of patients infected by different phenotypes. Moreover, the presence of an epidemic clone with different epidemiological behavior forced us to reduce the sample further. Finally, medical staff were not blinded to the rectal surveillance status.

To our knowledge, this is the first study to focus on the ability of PA to develop infection among PA-colonized patients by means of serial active surveillance and genotypic studies. It demonstrates definitively that PA intestinal colonization is a key requirement for the development of PA infection in ICU patients. Additional epidemiological studies are needed to confirm the implications of resistance in clinical invasiveness and to guide antibiotic policy by allowing a more judicious use of the few antimicrobial options available.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by National Health Service grant FIS 11/00164 from the Fondo de Investigación Sanitarias and by Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III; the Spanish Network for the

Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008); the Ciber de Enfermedades Respiratorias (CB06/06/0037); and FEDER funds (“A Way To Build Europe”).

We thank Cristian Tebé, Statistical Advisor Service, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), for his support in the statistical analyses and Michael Maudsley, Department of Languages, University of Barcelona, for revising the English-language manuscript.

We declare that we have no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B, Fridkin S, National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. 2013. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 14:1–14. <http://dx.doi.org/10.1086/668770>.
2. Livermore DM. 2002. Multiple mechanism of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare. *Clin Infect Dis* 34:634–640. <http://dx.doi.org/10.1086/338782>.
3. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:1–12. <http://dx.doi.org/10.1086/595011>.
4. Abdelraouf K, Kabbara S, Ledesma KR, Poole K, Tam VH. 2011. Effect of multidrug resistance-conferring mutations on fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 66:1311–1317. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr105>.
5. Sun Z, Jiao X, Peng Q, Jiang F, Huang Y, Zhang J, Yao F. 2013. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness. *Cell Physiol Biochem* 31:347–354. <http://dx.doi.org/10.1159/000343372>.
6. Giamarellos-Bourboulis EJ, Plachouras D, Tzivra A, Kousoulas V, Bolanos N, Raftogiannis M, Galani I, Dontas I, Dionysiou-Asteriou A, Giamarellou H. 2004. Simulation of innate immunity by susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an *in vitro* and *in vivo* study. *Clin Exp Immunol* 135:240–246. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2003.02365.x>.
7. Kugelberg E, Löfmark S, Wretling B, Andersson DI. 2005. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 55:22–30. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh505>.
8. Andersson DI, Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8:260–271. <http://dx.doi.org/10.1037/nrmicro2319>.
9. Peña C, Gómez-Zorrilla S, Suárez C, Dominguez MA, Tubau F, Arch O, Oliver A, Pujol M, Ariza J. 2012. Extensively drug-resistant *Pseudomonas*

- aeruginosa*: risk of bloodstream infection in hospitalized patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31:2791–2797. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-012-1629-3>.
10. Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. 1999. Characteristic of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Am J Respir Crit Care Med 160:1212–1219. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.160.4.9809031>.
 11. Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, Hélias JP. 2001. Endemicity, molecular diversity and colonization routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. Intensive Care Med 27:1263–1268. <http://dx.doi.org/10.1007/s001340100979>.
 12. Blot S, Depuydt P, Vogelaers D, Decruyenaere J, De Waele J, Hoste E, Peleman R, Claeys G, Verschraegen G, Colardyn F, Vandewoude K. 2005. Colonization status and appropriate antibiotic therapy for nosocomial bacteremia caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria in an intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol 26:575–579. <http://dx.doi.org/10.1086/502575>.
 13. Peña C, Guzmán A, Suarez C, Dominguez MA, Tubau F, Pujol M, Gudiol F, Ariza J. 2007. Effects of carbapenem exposure on the risk for digestive tract carriage on intensive care unit-endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in critically ill patients. Antimicrob Agents Chemother 51:1967–1971. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01483-06>.
 14. Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. 1993. The gastrointestinal tract: the “undrained abscess” of multiple organ failure. Ann Surg 218:111–119. <http://dx.doi.org/10.1097/00000658-199308000-00001>.
 15. Noone MR, Pitt TL, Bedder M, Hewlett AM, Rogers KB. 1983. *Pseudomonas aeruginosa* colonization in an intensive therapy unit: role of cross infection and host factors. Br Med J (Clin Res Ed) 286:341–344. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.286.6362.341>.
 16. Ohara T, Itoh K. 2003. Significance of *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract. Intern Med 42:1072–1076. <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.42.1072>.
 17. Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Cañizares R, Periche E, Dominguez MA, Ariza J, Peña C. 2014. Clinical invasiveness on patients with multidrug-resistant (MDR) and non-MDR *Pseudomonas aeruginosa* (PA) colonization, abstr K1047. Abstr 54th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, Washington, DC, 5 to 9 September 2014.
 18. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. 1987. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J Chronic Dis 40:373–383. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8).
 19. Le Gall JR, Loirat P, Alperovitch A, Glaser P, Granthil C, Mathieu D, Mercier P, Thomas R, Villers D. 1984. A simplified acute physiology score for ICU patients. Crit Care Med 12:975–977. <http://dx.doi.org/10.1097/00003246-198411000-00012>.
 20. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. 1988. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control 16:128–140. [http://dx.doi.org/10.1016/0196-6553\(88\)90053-3](http://dx.doi.org/10.1016/0196-6553(88)90053-3).
 21. Craven DE, Hialmarson KI. 2010. Ventilator-associated tracheobronchitis and pneumonia: thinking outside the box. Clin Infect Dis 51(Suppl 1):S59–S66. <http://dx.doi.org/10.1086/653051>.
 22. Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens JP, Lew PD, Suter PM. 1991. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic “blind” bronchoalveolar lavage fluid. Am Rev Respir Dis 143:1121–1129. http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/143.5_Pt_1.1121.
 23. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske GK, Harbarth S, Hindler JF, Kahimeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 18:268–281. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
 24. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22nd informational supplement. CLSI M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 25. Deplano A, Denis O, Poriel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, Nordmann P, Vincent JL, Struelens MJ. 2005. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 43:1198–1204. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.3.1198-1204.2005>.
 26. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33:2233–2239.
 27. Gómez-Zorrilla S, Camoez M, Tubau F, Periche E, Cañizares R, Dominguez MA, Ariza J, Peña C. 2014. Antibiotic pressure is a major risk factor for rectal colonization by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. Antimicrob Agents Chemother 58:5863–5870. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03419-14>.
 28. Latibeaudiere R, Rosa R, Laowansiri P, Arheart K, Namias N, Munoz-Price LS. 2015. Surveillance cultures growing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* predict the development of clinical infections: a retrospective cohort study. Clin Infect Dis 60:415–422. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu847>.
 29. Suarez S, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, Gavalda L, Sora M, Oliver A, Pujol M, Ariza J. 2011. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. BMC Infect Dis 11:272. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-11-272>.

Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk of bloodstream infection in hospitalized patients

C. Peña · S. Gómez-Zorrilla · C. Suarez ·
M. A. Dominguez · F. Tubau · O. Arch · A. Oliver ·
M. Pujol · J. Ariza

Received: 27 January 2012 / Accepted: 11 April 2012 / Published online: 4 May 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Several studies have suggested that resistance determinants usually reduce virulence. However, their contribution to decrease bloodstream infections is unclear. Our aim was to identify risk factors of extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* (PA) bacteremia and to assess the prevalence of XDR-PA bacteremia. A retrospective study of PA bloodstream infections in our patient population with at least one clinical sample isolate due to PA (2006–2007) was carried out. A total of 2,131 patients with PA clinical samples were detected. Among 1,657 patients with susceptible-PA isolates, 95 developed PA-susceptible bacteremia. Concomitantly, among 474 patients with multidrug-resistant (MDR)-PA isolates, 265 with XDR-PA, and 209 with non-XDR MDR-PA, 43 developed XDR-PA bacteremia and 13 non-XDR MDR-PA bacteremia, respectively. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) revealed the clonal nature of the two predominant XDR-PA phenotypes and genetic heterogeneity in non-XDR MDR-PA phenotypes. The proportion of XDR-PA bacteremia was higher than the proportion of bacteremia in the susceptible-PA population (16 % vs. 6 %; $p < 0.001$). A logistic regression

model identified prior exposure to fluoroquinolones [odds ratio (OR) 2.80; 95 % confidence interval (CI) 1.02 to 7.70] as the independent variable associated with XDR-PA bacteremia. Our study suggests that XDR-PA strains have a greater ability to develop bacteremia. It remains unclear as to whether this invasive capacity depends on clonal traits or on other virulence determinants.

Introduction

The emergence of a continuously evolving resistance to multiple antimicrobial agents in *Pseudomonas aeruginosa* has become a significant health problem. Few effective antibiotics are available for treating infections, and, in some cases, none at all [1].

Previous treatment with antibiotics characterized by high antipseudomonal activity [2–9] and prolonged antibiotic treatment [10, 11] are both recognized risk factors for the emergence of drug-resistant *P. aeruginosa*. The acquisition of resistant strains is associated with significantly longer hospital stays and an increased rate of secondary bacteremia in patients with *P. aeruginosa* infection [12]. However, experimental in vitro and animal findings have suggested that resistance genes or mutations can alter the fitness and virulence of the microorganisms [13]. Thus, the extent to which a supposed lower virulence of multidrug-resistant *P. aeruginosa* (MDR-PA) modulates its ability to cause bloodstream infections remains a controversial issue [14, 15].

To date, a variety of definitions of antimicrobial resistance have been used [16, 17], a situation that has caused considerable confusion among researchers and clinicians. However, a recent consensus document [1] proposed a set of definitions of resistance to multiple antimicrobial agents in pathogenic bacteria which is likely to improve the comparability of surveillance

C. Peña (✉) · S. Gómez-Zorrilla · C. Suarez · O. Arch ·
M. Pujol · J. Ariza
Infectious Diseases Service, IDIBELL,
Hospital Universitari de Bellvitge,
Barcelona, Spain
e-mail: cpena@bellvitgehospital.cat

M. A. Dominguez · F. Tubau
Microbiology Service, IDIBELL,
Hospital Universitari de Bellvitge,
Barcelona, Spain

A. Oliver
Microbiology Service, Hospital Universitario Son Espases,
Palma de Mallorca, Spain

data. While the risk factors for carbapenem-resistant [2, 6] or other MDR-PA classified using different definitions [3–5, 7–9, 11] have been examined in detail, to our knowledge, no study has focused on the risk factors and the concomitant clinical and epidemiological behavior of even extensively drug-resistant *P. aeruginosa* (XDR-PA) applying these new definitions.

Since 2005, a progressive increase in the number of MDR-PA isolates has been observed in our hospital and a surveillance program has been in place to identify patients colonized or infected with MDR-PA. Therefore, the objectives of this study were: (i) to examine the risk factors for XDR-PA bacteremia and (ii) to assess the prevalence of XDR-PA bacteremia in an XDR-PA colonized population.

Materials and methods

Setting and study population

The study was performed at the Hospital Universitari de Bellvitge, an 800-bed public tertiary-care institution for adult patients. A retrospective microbiological review in 2005 showed a progressive increase in *P. aeruginosa* strains exhibiting the same multiresistant antibiotic type, and molecular typing of selected strains demonstrated the presence of clonal dissemination. The MDR-PA surveillance program was initiated in January 2006 and all consecutive patients with a clinical sample isolate due to *P. aeruginosa* were detected through a daily laboratory review of multiple antimicrobial-resistant *P. aeruginosa*.

A retrospective study of all patients who had been hospitalized for more than 48 h between January 2006 and December 2007 and who presented episodes of *P. aeruginosa* bacteremia according to the database at our microbiology laboratory was performed. Concomitantly, to estimate the risk of bloodstream infection of the different phenotypes of *P. aeruginosa* strains, we assessed all patients who presented at least one *P. aeruginosa* specimen during admission. The *P. aeruginosa* population was stratified according to a recent consensus document on the MDR and susceptible population. The patients without MDR phenotype *P. aeruginosa* clinical sample isolates between 48 h after admission and the time of discharge were considered as having susceptible strains. Routine screening for *P. aeruginosa* carriage was not performed.

Definitions and data collection

In accordance with recent standard definitions [1], MDR-PA was defined as a strain non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antipseudomonal antimicrobial categories. XDR-PA was defined as non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 antipseudomonal antimicrobial categories; thus, an XDR-PA isolate

was also included as MDR-PA. To study the specific epidemiology of XDR-PA, MDR-PA isolates were distributed as follows: XDR-PA according to the above definition and non-XDR MDR-PA defined as PA strains non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antipseudomonal antimicrobial categories but susceptible in at least > 2 antipseudomonal antimicrobial classes. All other *P. aeruginosa* isolates, including those non-susceptible to ≥ 1 agent in < 3 antimicrobial categories, were considered to be susceptible.

The data collected from the patients with bacteremia were as follows: demographic characteristics, underlying disease calculated using the Charlson comorbidity index [18], intensive care unit (ICU) admission, surgery, the use of vascular or urinary catheters, or other invasive procedures during the previous month to the blood *P. aeruginosa* isolate being detected. Prior antibiotic exposure was defined as the administration of antimicrobials for more than 48 h within 90 days of the onset of *P. aeruginosa* bacteremia.

In addition, all *P. aeruginosa* isolates from clinical samples preceding bacteremia were collected. The number and origin of clinical samples of the total population colonized or infected by *P. aeruginosa* was also identified.

Microbiological studies

P. aeruginosa strains were identified and tested for antimicrobial susceptibility by a MicroScan automated microdilution system using CN1S and CO1S panels (Dade International, West Sacramento, CA, USA). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria [19, 20] were used to define susceptibility or resistance to these antimicrobial agents. The antibiotics tested were: piperacillin–tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, ofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, colistin, and fosfomycin. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed with non-XDR MDR-PA blood isolates [21]. The molecular epidemiology and the mechanisms responsible for XDR phenotype have been described previously [22, 23].

Statistical analysis

The ability to cause bloodstream infections was defined as the proportion of XDR-PA and non-XDR MDR-PA bacteremia among the patient population colonized or infected by XDR or non-XDR MDR-PA strains compared with the proportion of susceptible-PA bacteremia among the patient population colonized or infected by susceptible strains. The calculation of the MDR (non-XDR MDR-PA and XDR-PA) population included all patients with MDR-PA for whom at least one specimen was obtained during admission; in patients with *P. aeruginosa* clinical samples during admission, but without

multiresistant phenotype, the strains were considered to be susceptible. We focused on hospitalized patients due to logistical difficulties in evaluating colonization in patients from the community setting. Thus, for this calculation and the predictive risk factor analysis, we excluded the non-hospital-acquired episodes. Logistic regression analysis was used to identify the independent risk factors for XDR-PA bacteremia acquisition versus susceptible-PA bacteremia. In addition, to determine the risk factors for non-clonal MDR-PA bacteremia, we compared non-XDR MDR-PA bacteremia versus susceptible-PA bacteremia. Variables with a p -value < 0.05 in the univariate analysis and those found in previous studies of MDR-PA were included in the multivariate model. Student's t -test was used to compare continuous variables. The chi-square test or Fisher's exact test was used to compare categorical variables. Data were analyzed using the SPSS (version 15.0) statistical software package.

Results

Epidemiological data

During the study period (January 2006 to December 2007), a total of 2,131 patients were detected with at least one clinical sample positive for *P. aeruginosa* during the admission: 1,657 patients with susceptible-PA isolates and 474 with MDR-PA isolates, of which 265 were XDR-PA. Concomitantly, 171 episodes of *P. aeruginosa* bacteremia were detected, in 112 (74 %) males and 40 (26 %) females, with a mean age of 64.93 ± 13.95 years. Among the 171 episodes, 151 (88 %) were hospital-acquired, nine (5 %) were strictly community-acquired, and the remaining 11 (7 %) were considered to be health care-associated infections [24]: five were nursing home residents and six had undergone an invasive procedure (four were recipients of antineoplastic chemotherapy and two

hemodialysis). All of the 20 non-nosocomial episodes excluded were susceptible-PA bacteremias.

Eighty-two percent of patients had a chronic comorbid condition, the most frequent being chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and solid malignancy [34 episodes each (22 %)].

There were differences in the source of *P. aeruginosa* isolates (Table 1) between XDR-PA and susceptible-PA bacteremia. In XDR-PA, isolates were more frequently detected in respiratory tract and urine samples, whereas in susceptible-PA, isolates were more frequently detected in surgical wound and respiratory tract samples.

Microbiological data

The rates of susceptibility of the bacteremia isolates to 15 antipseudomonal antibiotics are shown in Table 2. Colistin (100 %) and amikacin (86 %) were the most frequently active agents in XDR-PA strains, and colistin (100 %), amikacin (85 %), and ceftazidime (69 %) were the most frequently active agents in non-XDR MDR-PA.

The clonal nature and the mechanisms responsible for the two predominant XDR phenotypes during the study period have been previously reported [22, 23]. Non-XDR MDR-PA isolates were further typed by PFGE, showing genetic heterogeneity. Among the ten evaluable strains, the genotype was non-coincident.

Risk factors for XDR-PA acquisition

Among the 151 nosocomial episodes, 95 (63 %) were caused by susceptible-PA strains and 56 (37 %) by MDR-PA. Among the latter, 43 (77 %) were caused by XDR-PA strains and 13 (23 %) were caused by non-XDR MDR-PA strains. The epidemiological characteristics are shown in Table 3.

Table 1 Clinical samples infected or colonized with *Pseudomonas aeruginosa* during the study period

Clinical sample	No. (%) of isolates					
	Bacteremia			Colonization/infection non-bacteremic		
	Susceptible ($n=95$)	XDR ($n=43$)	Non-XDR MDR ($n=13$)	Susceptible ($n=1,562$)	XDR ($n=222$)	Non-XDR MDR ($n=196$)
Urine	40 (42)	27 (63)	4 (31)	282 (18)	169 (76)	64 (33)
Respiratory tract	49 (51.5)	36 (84)	13 (100)	684 (44)	207 (93)	109 (56)
Wound	2 (2)	4 (9)	2 (15)	752 (48)	89 (40)	51 (26)
Catheter	16 (17)	13 (30)	4 (31)	194 (12)	41 (18)	15 (8)
Abdominal	1 (1)	6 (14)	0	90 (6)	21 (9)	13 (7)
Other	3 (3)	0	0	244 (16)	60 (27)	21 (11)
Total	111 (50.5)	86 (39)	23 (10.5)	2,246 (72)	587 (19)	273 (9)

Table 2 Susceptibilities to different antimicrobial agents of 151 multiple antimicrobial-resistant *P. aeruginosa* from blood cultures

Antimicrobial agent	XDR-PA No. (%) of resistant isolates	Non-XDR MDR-PA No. (%) of resistant isolates	Susceptible-PA No. (%) of resistant isolates
Antipseudomonal penicillins+ β -lactamase inhibitors			
Piperacillin–tazobactam	40 (93 %)	8 (62 %)	0
Monobactam			
Aztreonam	40 (93 %)	7 (54 %)	11 (12 %)
Aminoglycosides			
Gentamicin	40 (93 %)	8 (62 %)	7 (7 %)
Tobramycin	40 (93 %)	6 (46 %)	2 (2 %)
Amikacin	6 (14 %)	2 (15 %)	2 (2 %)
Fluoroquinolones			
Ofloxacin	43 (100 %)	8 (62 %)	6 (6 %)
Ciprofloxacin	43 (100 %)	9 (69 %)	6 (6 %)
Antipseudomonic cephalosporins			
Ceftazidime	35 (81 %)	4 (31 %)	1 (1 %)
Cefepime	35 (81 %)	7 (54 %)	0
Carbapenems			
Imipenem	34 (79 %)	5 (38 %)	5 (5 %)
Meropenem	35 (81 %)	5 (38 %)	1 (1 %)
Phosphonic acids			
Fosfomycin	37 (86 %)	6 (46 %)	47 (49 %)
Polymyxins			
Colistin	0	0	0

Compared with the susceptible-PA bacteremia, most of the parameters were not significantly associated with antimicrobial resistance acquisition. COPD was the only comorbid condition predictive of XDR-PA, and the mean number of days between hospital admission and bacteremia onset was significantly higher in episodes with XDR-PA; moreover, the severity of underlying disease according to the Charlson comorbidity score and ICU admission was similar in the two groups. Fluoroquinolones were significantly associated with the risk of acquisition of XDR-PA strains (21.5 % vs. 50 %; $p=0.004$). A logistic regression model with XDR-PA bacteremia as the dependent variable, with adjustment for age, sex, days to admission from bacteremia onset, COPD, prior fluoroquinolone consumption, days of prior antibiotics, clinical samples and number preceding bacteremia, identified prior exposure to fluoroquinolones [odds ratio (OR) 2.80; 95 % confidence interval [CI] 1.02–7.70; $p=0.04$] as the only independent risk factor associated with XDR-PA. We observed a trend of COPD comorbidity (OR 2.81; 95 % CI 0.96–8.15; $p=0.057$) linked to XDR-PA acquisition.

In addition, comparing non-XDR MDR-PA bacteremia with susceptible-PA bacteremia, the severity of underlying disease according to the Charlson comorbidity score was significantly major in non-XDR MDR-PA bacteremia (21 % vs. 54 %; $p=0.001$) and there was a trend for the prior use of piperacillin–tazobactam in non-XDR MDR-PA bacteremia

(21.5 % vs. 46 %; $p=0.06$). A logistic regression model with XDR-PA bacteremia as the dependent variable, with adjustment for age, sex, days to admission from bacteremia onset, COPD, prior piperacillin–tazobactam consumption, days of prior antibiotics, clinical samples and number preceding bacteremia, identified days of prior antibiotic exposure (OR 1.1; 95 % CI 1.02–1.20; $p=0.01$) and severity (Charlson index >3) of underlying disease (OR 8.2; 95 % CI 1.34–50.2; $p=0.02$) as independent risk factors for non-XDR MDR-PA acquisition. In addition, we observed a trend for prior colonization with clinical samples other than blood isolates (OR 8.4; 95 % CI 0.76–93.2; $p=0.058$) linked to non-XDR MDR-PA acquisition.

Ability to cause bloodstream infection

Among the 1,657 patients with clinical samples due to susceptible-PA, 95 (6 %) patients had bloodstream infections; in addition, 13 of 209 (6 %) patients with non-XDR MDR-PA clinical isolates and 43 of 265 (16 %) patients with XDR-PA clinical isolates developed bacteremia. The frequency of bacteremia was, thus, greater in XDR-PA patients than in susceptible-PA patients [43 (16 %) vs. 95 (6 %); $p<0.001$; OR 3.1, 95 % CI 2.10–4.74] and similar in non-XDR MDR-PA and susceptible-PA patients [13 (6 %) vs. 95 (6 %); $p=0.74$; OR 1.09, 95 % CI 0.60–1.99].

Table 3 Epidemiological characteristics of nosocomial bloodstream infection due to multiple antimicrobial-resistant *P. aeruginosa*

Characteristic	Susceptible-PA <i>n</i> =95 (63 %)	XDR-PA <i>n</i> =43 (28.5 %)	<i>p</i> -value	Non-XDR MDR-PA <i>n</i> =13 (8.5 %)	<i>p</i> -value*
Age (mean±SD)	65.06±13.88	64.70±13.29	0.55	64.85±17.92	0.35
Male sex	67 (70.5)	37 (86)	0.057	7 (54)	0.22
Days between admission and bacteremia (mean±SD)	14.53±13.23	20.95±19.13	0.032	23.15±20.31	0.026
ICU stay	37 (39)	20 (46.5)	0.45	6 (46)	0.61
Charlson index>3	20 (21)	15 (35)	0.08	7 (54)	0.01
Underlying condition					
Any	76 (80)	37 (86)	0.47	11 (85)	0.51
Chronic obstructive pulmonary disease	12 (13)	16 (37)	0.002	6 (46)	0.002
Solid malignancy	19 (20)	11 (26)	0.50	3 (23)	0.52
Diabetes	18 (19)	9 (21)	0.81	4 (31)	0.46
Immunosuppressive therapy	19 (20)	12 (28)	0.37	2 (15)	0.51
Cardiopathy	21 (22)	5 (12)	0.16	2 (15)	0.44
Chronic renal failure	17 (18)	7 (16)	0.81	4 (31)	0.22
Hematologic malignancy	4 (4)	4 (9)	0.25	0	–
Neurologic disease	16 (17)	5 (12)	0.61	0	–
Neutropenia	3 (3)	1 (2)	0.78	1 (8)	0.40
Cirrhosis	6 (6)	6 (14)	0.19	1 (8)	0.60
AIDS	2 (2)	1 (2)	0.93	0	–
Polymicrobial bacteremia	27 (28)	8 (19)	0.29	5 (38.5)	0.45
Clinical intervention					
Venous catheter	72 (76)	35 (81)	0.51	8 (61.5)	0.27
Urinary catheter	66 (69.5)	36 (84)	0.078	7 (54)	0.25
Mechanical ventilation	31 (33)	18 (42)	0.33	5 (38.5)	0.67
Prior surgery	49 (52)	21 (49)	0.85	6 (46)	0.71
Prior antibiotics	64 (67)	38 (88)	0.009	13 (100)	0.015
Amoxicillin–clavulanic acid	37 (57)	16 (42)	0.15	7 (54)	0.83
Piperacillin–tazobactam	14 (21.5)	14 (37)	0.092	6 (46)	0.064
Carbapenems	8 (12)	8 (21)	0.26	3 (23)	0.30
Fluoroquinolones	14 (21.5)	19 (50)	0.004	3 (23)	0.90
Aminoglycosides	5 (8)	7 (18)	0.10	3 (23)	0.095
Cephalosporins	8 (12)	7 (18)	0.40	1 (8)	0.63
Antipseudomonic cephalosporins	7 (11)	4 (10.5)	0.96	1 (8)	0.73
Days of prior antibiotics (mean±SD)	15.20±9.4	20.74±12.5	0.039	28.00±24.67	0.004
Clinical samples colonization	56 (59)	32 (74)	0.08	10 (77)	0.20
Number of samples					
1–2 samples	42 (44)	21 (49)		5 (38.5)	
3–4 samples	8 (8.5)	6 (14)		4 (32)	
≥5 samples	6 (6)	5 (12)		1 (8)	
Clinical samples origin					
Urine	28 (29.5)	21 (49)	0.02	5 (38.5)	0.50
Respiratory tract	26 (27)	15 (35)	0.37	7 (54)	0.05
Wound	6 (6)	6 (14)	0.14	2 (15)	0.24
Catheter	15 (16)	10 (23)	0.30	3 (21)	0.50
Primary bacteremia	44 (46)	21 (49)	0.80	6 (46)	0.99
Vascular catheter	37	14		4	
Unknown	7	7		2	
Secondary bacteremia	51 (54)	22 (51)		7 (54)	
Urinary	28	13		3	
Intra-abdominal	14	2		2	
Respiratory	8	6		2	
Other	1	1		0	

*Susceptible-PA vs. non-XDR MDR-PA

Among the 151 episodes of *P. aeruginosa*, 48 (32 %) had prior clinical samples other than blood samples: 20 (47 %) in XDR-PA episodes, 6 (46 %) in non-XDR MDR-PA episodes, and the remaining 20 (23 %) in susceptible-PA bacteremia.

Discussion

Our study revealed a larger proportion of bacteremic infections in patients with XDR-PA strains than in other colonized or infected patients with susceptible strains (16 % vs. 6 %). It is worth noting that the resistance profile of 80 % of the XDR strains included all antipseudomonal agents except amikacin and colistin. In previous reports, we analyzed the mechanisms of resistance of some of our strains of *P. aeruginosa* with XDR phenotype [22, 23], but we did not carry out an extensive evaluation of how the different drug resistance levels may contribute to the bacterial virulence and invasiveness.

Interestingly, polyclonal non-XDR MDR-PA strains which also exhibited a high proportion of resistance to antimicrobials were less invasive than XDR-PA strains (6 % vs. 16 %). This finding suggests that the epidemic nature of XDR-PA strains explains their greater capacity to develop bloodstream infections. It remains to be established as to whether this ability depends on specific traits of the limited number of clonal lineages involved [22, 23] in XDR-PA strains regarding the acquisition of fitness cost compensatory mutations or on the expression of other virulence determinants [14].

Previous and prolonged antibiotic treatment [2, 10, 11], invasive procedures [7, 8, 25], and severity of underlying disease are recognized risk factors for the emergence of drug-resistant microorganisms. Compared with susceptible-PA bacteremia, a significant association was found between non-XDR MDR-PA bacteremia and the severity of underlying disease, as well as the number of days of prior antibiotic exposure. In fact, all non-XDR MDR-PA patients had been exposed to antibiotic therapy, and the risk of emergence of resistance in the course of or after using antibiotics is well recognized [4].

In parallel, 88 % of XDR-PA patients received prior antibiotic therapy, and fluoroquinolones use was significantly associated with XDR-PA acquisition. As universal substrates for the efflux systems of *P. aeruginosa* [26], the selection of strains expressing multiple antimicrobial resistance may be expected following fluoroquinolone exposure [7, 8, 11, 27]. In addition, the widespread hospital use of fluoroquinolones may also increase the number of XDR-PA colonized patients and, consequently, the pressure of colonization.

Differences were found regarding sources of clinical samples according to different phenotypes in our study. Respiratory tract clinical samples were more frequently detected in XDR-PA or non-XDR MDR-PA patients; in addition, COPD was the main comorbid condition in MDR patients. A possible explanation for this association

is that a subset of adults with COPD may become chronically colonized with *P. aeruginosa*, and is associated with more advanced pulmonary disease [28]. Individuals with advanced COPD are more likely to receive courses of antimicrobial therapy, which easily selects antibiotic-resistant *P. aeruginosa* due to the high prevalence of hypermutable strains in this setting [29].

The analysis of our results has some limitations. It is a small retrospective study with all the inherent problems related to this study design and small sample size. We did not systematically screen our patients for the presence of *P. aeruginosa* by means of an active surveillance culture, and, so, the number of carriers in the different groups may be underestimated. In addition, although we did not perform a thorough molecular epidemiology analysis in all XDR-PA strains, previous data [22, 23] indicate the involvement of a limited number of clones in the XDR phenotypes, suggesting a substantial degree of cross-transmission in the infections by XDR strains, which may have modulated the impact of antibiotic pressure. However, the two groups may not be mutually exclusive, since an unknown component of horizontal transmission is facilitated by antibiotics that increases the density of colonization with resistant organisms [30].

To our knowledge, this is the first study to focus on the risk factors of multiple antimicrobial-resistant *P. aeruginosa* that applies recent standard definitions for acquired resistance [1] and may well help to improve the comparability of surveillance data. In conclusion, prior fluoroquinolone use predicted XDR in patients with *P. aeruginosa* bloodstream infections at our institution. Despite the limitations mentioned above, our study suggests that XDR *P. aeruginosa* presents an enhanced invasive capacity, although future prospective studies are needed in order to achieve a more thorough understanding of the interplay between epidemic, antibiotic resistance, fitness, and virulence in the clinical setting.

Acknowledgments This work was supported by the National Health Service grant FIS 08/0276 from the Fondo de Investigación Sanitarias and supported by Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF) “A way to achieve Europe”, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008), and by the Ciber de Enfermedades Respiratorias (CB06/06/0037).

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

2. Troillet N, Samore MH, Carmeli Y (1997) Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin Infect Dis* 25:1094–1098
3. Harris A, Torres-Viera C, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore M, Carmeli Y (1999) Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 28:1128–1133
4. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH (1999) Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1379–1382
5. El Amari EB, Chamot E, Auckenthaler R, Pechère JC, van Delden C (2001) Influence of previous exposure to antibiotic therapy on the susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates. *Clin Infect Dis* 33:1859–1864
6. Harris AD, Smith D, Johnson JA, Bradham DD, Roghmann MC (2002) Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 34:340–345
7. Cao B, Wang H, Sun H, Zhu Y, Chen M (2004) Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect* 57:112–118
8. Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N, Gouby A, Mahamat A, Daurès JP et al (2004) Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *J Hosp Infect* 57:209–216
9. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y (2006) Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 50:43–48
10. Philippe E, Weiss M, Shultz JM, Yeomans F, Ehrenkranz NJ (1999) Emergence of highly antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in relation to duration of empirical antipseudomonal antibiotic treatment. *Clin Perform Qual Health Care* 7:83–87
11. Paramythiotou E, Lucet JC, Timsit JF, Vanjak D, Paugam-Burtz C, Trouillet JL et al (2004) Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis* 38:670–677
12. Carmeli Y, Troillet N, Karchmer AW, Samore MH (1999) Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Intern Med* 159:1127–1132
13. Giamarellos-Bourboulis EJ, Plachouras D, Tzivra A, Kousoulas V, Bolanos N, Raftogiannis M et al (2004) Stimulation of innate immunity by susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro and in vivo study. *Clin Exp Immunol* 138:240–246
14. Abdelraouf K, Kabbara S, Ledesma KR, Poole K, Tam VH (2011) Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 66:1311–1317
15. Hocquet D, Berthelot Ph, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O et al (2007) *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3531–3536
16. Paterson DL, Doi Y (2007) A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 45:1179–1181
17. Falagas ME, Karageorgopoulos DE (2008) Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis* 46:1121–1122
18. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR (1987) A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 40:373–383
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2009) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. CLSI, Wayne, PA; vol. 29, no. 3
20. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2008) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (updated 27 April 2010; last accessed 29 October 2010). Available online at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.1
21. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233–2239
22. Peña C, Suarez C, Tubau F, Juan C, Moya B, Dominguez MA et al (2009) Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1 β -lactamase. *J Clin Microbiol* 47:2381–2387
23. Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C et al (2011) A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. *BMC Infect Dis* 11:272–279
24. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP et al (2002) Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 137:791–797
25. Tumbarello M, Repetto E, Trecarichi EM, Bernardini C, de Pascale G, Parisini A et al (2011) Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and mortality. *Epidemiol Infect* 139:1740–1749
26. Poole K (2000) Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2233–2241
27. López-Dupla M, Martínez JA, Vidal F, Almela M, Soriano A, Marco F et al (2009) Previous ciprofloxacin exposure is associated with resistance to β -lactam antibiotics in subsequent *Pseudomonas aeruginosa* bacteremic isolates. *Am J Infect Control* 37:753–758
28. Murphy TF (2009) *Pseudomonas aeruginosa* in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 15:138–142
29. Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A (2005) Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3382–3386
30. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Hoyer CK, Hanrahan JA, Huger AM et al (2000) Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant Enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 343:1925–1932

Microbial Drug Resistance - Decision on Manuscript ID MDR-2016-0144.R1

15-Sep-2016

Dear Dr. Peña:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Acute inflammatory response of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infections: a prospective study." in its current form for publication in Microbial Drug Resistance.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

All authors will get a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement form.

The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright. The corresponding author will receive notification when all copyright forms have been submitted.

Consider Liebert Open Option to have your paper made free online immediately upon publication for a one-time fee. Benefits of Liebert Open Option include: accelerated e-pub ahead of print publication; email message highlighting the article; increased readers, citations and downloads; an identifying icon in the table of contents showing that the paper is permanently available for free to all readers; and immediate deposition into PubMed Central®. Please contact OpenAccess@liebertpub.com or call (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf) to your Librarian.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Microbial Drug Resistance, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Alexander Tomasz
Editor-in-Chief, Microbial Drug Resistance
tomasz@mail.rockefeller.edu

Date Sent:

15-Sep-2016

Acute Inflammatory Response of Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Prospective Study

Silvia Gómez-Zorrilla,¹ Francisco Morandeira,² María José Castro,³ Fe Tubau,⁴ Elisabet Periche,⁵ Rosario Cañizares,⁵ María Angeles Dominguez,⁴ Javier Ariza,¹ and Carmen Peña¹

The severity of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infection may be determined by the interaction with the host immune system. We designed a prospective study to assess the relationship between the inflammatory response and the clinical presentation and outcome of PA infection. We also investigated whether there are differences in the inflammatory response depending on the resistance profile of PA. Interleukin-6 (IL-6), IL-10, procalcitonin (PCT), and C-reactive protein (CRP) were measured. Sixty-nine infection episodes were recorded; 40 caused by non-multidrug-resistant (non-MDR) strains [29 (73%) respiratory; 8 (20%) bacteremia], 12 by MDR non-extensively drug-resistant (MDR-non-XDR) [9 (75%) respiratory; 3 (25%) bacteremia], and 17 by XDR strains [9 (53%) respiratory; 7 (41%) bacteremia]. All inflammatory parameters were significantly higher in patients who developed acute organ dysfunction and bacteremia. PCT levels were higher in patients with early mortality [$p=0.050$]. Inflammatory biomarkers were higher in patients with XDR than in those with non-MDR PA [IL-6 430 (67–951) vs. 77 (34–216), $p=0.02$; IL-10 3.3 (1.5–16.3) vs. 1.3 (0–3.9), $p=0.02$; and PCT 1.1 (0.6–5.2) vs. 0.3 (0.1–1.0), $p=0.008$]. The intensity of inflammatory response was associated with the severity of PA infection, particularly if bacteremia occurred. Only PCT was documented useful to predict the outcome. XDR infections presented a higher inflammatory response; related in part to the larger number of bloodstream infections in this group.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, microbial drug resistance, nosocomial infections, infections

Introduction

PSEUDOMONAS AERUGINOSA (PA) IS a common and serious cause of nosocomial infections. Mortality due to PA bacteremia may be as high as 50% within the first 24–72 hr.^{1,2} Poor outcomes in PA infections have been associated with factors related to the antibiotic treatment, microorganism, and host. The presence of multidrug-resistant (MDR) strains reduces treatment options and raises the risk of receiving an inadequate initial antimicrobial treatment. Nonetheless, previous studies by our group found that early

mortality was higher in non-MDR than MDR PA infections, suggesting that non-MDR PA infections have a more virulent behavior.^{1–3} It is known that the severity of acute illness presentation is associated with a higher mortality,^{4,5} and probably differences in the presentation of acute illness is determined not only by the production of PA virulence factors, but also by the interaction between the bacteria and the host innate immune system.

The early phase of sepsis is dominated by a hyperinflammatory state mediated by a systemic production of cytokines, as interleukin 6 (IL-6), which are required for

¹Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

²Immunology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

³Clinical Biochemistry Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁴Microbiology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁵Intensive Care Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

adequate host defense against infection. Occurring almost simultaneously, the production of anti-inflammatory cytokines (IL-10), reduces local and systemic toxicity, and serves to balance the inflammatory state. However, an excessive inflammatory response may progress to sepsis and, ultimately, multiple organ dysfunction syndrome; on the other hand, an excessive anti-inflammatory response may hamper the resolution of the infection.^{6,7} Several researchers have shown that the levels of both pro- and anti-inflammatory cytokines may be correlated with illness severity and that unbalanced inflammatory response is a strong predictor of mortality.^{8–10} In addition, other biomarkers of inflammation have been widely used as clinical markers of bacterial infections. C-reactive protein (CRP) is an acute-phase reactant synthesized by the liver during the inflammation with both proinflammatory and anti-inflammatory effects.¹¹ More recently, Procalcitonin (PCT), the prohormone of calcitonin, has demonstrated to be a useful marker for the diagnosis of sepsis. Among its advantages, PCT shows a favorable kinetic profile in sepsis, as appears in plasma earlier and longer than CRP or cytokines. Moreover, PCT levels correlate with the severity of the infection.^{11,12} Despite its usefulness, the biological role of PCT in sepsis is still unknown.¹¹

To date, several studies in severe pneumonia^{13–15} and in sepsis^{16,17} have evaluated the inflammatory response; however, data regarding the inflammatory response in acute PA infections are limited^{18,19} and in fact the issue has not been examined in humans. Nor has the possible correlation of multidrug resistance with the ability of the pathogens to elicit immune response been assessed.¹⁸

We designed a prospective study of PA infections in an ICU unit to assess the profile of the inflammatory response in PA infection. We measured several molecular inflammatory markers at two serial time points to: (i) determine the sequential changes in the expression of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and other markers of inflammation (PCT and CRP) in blood, during the first 48 hr after the onset of PA infection, (ii) analyze the relationship between these markers and the severity of the presentation of the acute illness and outcome, and (iii) establish whether there are differences in the molecular inflammatory response depending on the antimicrobial resistant profile of the PA strain.

Materials and Methods

Setting and design

This prospective cohort study was performed at one of the three general ICUs at the Hospital Universitari de Bellvitge, a 700-bed tertiary-care institution for adult patients in Barcelona. The ICU is a 12-bed, private room ward providing care to medical and surgical patients, including those who have undergone solid organ transplantation. The study included all patients admitted to the ICU for more than 48 hr during an 18-month period (1 January, 2012 to 1 July, 2013). An active surveillance study was performed as previously reported.²⁰ Patients were prospectively monitored from ICU admission to ICU discharge, through daily clinical evaluation to detect whether they presented any sign of infection. In addition, a daily review of microbiological cultures was performed. When any patient presented clinical parameters of infection, clinical and blood sample were

collected for the microbiological diagnostic and to analyze inflammatory biomarkers, respectively. Despite the prospective design of the study, the differentiation between infection and colonization is often difficult in critically ill patients. For this reason, we excluded nonbacteriemic urinary tract infections from the study, in addition to skin and soft tissue infections. Only evident acute infections with clinical significance were included: respiratory tract infections, bacteremia, or other infections in which the clinical sample has been obtained by surgery or sterile puncture (e.g., intra-abdominal). All patients with PA infection were recruited in the study prospectively. Patients with any of the following criteria were excluded: length of ICU stay lower than 48 hr, polymicrobial infection; patients with other concomitant infection; and patients with do-not-resuscitate orders. The local Ethics Committee of our hospital approved the study, and patients or family provided informed consent.

Definitions

The following data were recorded: age and sex; comorbidities and severity of underlying diseases calculated using the Charlson comorbidity index²¹ and severity of illness estimated by the Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) in patients at ICU admission and at the onset of infection.²² Additionally, to analyze data according to the immune status, we created the variable “immunocompromised,” which included solid or hematologic malignancy, neutropenia, or patients under immunosuppressant treatment. The onset of PA infection was defined as the day in which the patient presented any sign of infection and clinical samples were collected for the microbiological diagnostic. In patients with multiple episode of infection, a second episode was defined when a new infection occurred at least 72 hr after the clinical resolution of the preceding episode. The source of infection was established according to the Centers for Disease Control and Prevention Criteria²³; in addition, ventilator-associated tracheobronchitis and ventilator-associated pneumonia were classified according to the clinical pulmonary infection score,²⁴ and the severity of acute bacteremic illness at presentation and 48 hr according to the Pitt bacteremia score.²⁵ Acute inflammatory response was classified as sepsis, severe sepsis, septic shock, and multiorgan dysfunction syndrome (MODS) according to consensus definitions.²⁶ We also used the sepsis-related organ failure assessment (SOFA) score and defined acute organ dysfunction as the dysfunction of three or more organs in any of six organ systems.²⁷ For outcomes, overall mortality was defined as death from any cause occurring in the 30 days after the onset of PA infection; mortality was considered as early in patients who died within the first 5 days.

The phenotype stratification of PA isolates was made in accordance with recent standard definitions.²⁸ MDR PA was defined as a strain nonsusceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antipseudomonal antimicrobial categories. Extensively drug-resistant (XDR) PA was defined as nonsusceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 antipseudomonal antimicrobial categories; thus, XDR PA isolates were included as MDR PA. To study the specific epidemiology of XDR PA, MDR PA isolates were distributed as follows: XDR PA as defined above, and MDR-non-XDR PA defined as PA strains nonsusceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antipseudomonal antimicrobial

INFLAMMATORY RESPONSE IN *P. AERUGINOSA* INFECTION

3

categories, but susceptible to at least >2 antipseudomonal antimicrobial classes. All other PA isolates, including those nonsusceptible to ≥ 1 agent in <3 antimicrobial categories, were considered non-MDR PA.

Collection of blood samples and laboratory processing

For all PA-infected patients, two serial blood samples were obtained at infection onset and 48 hr later. We measured circulating levels of IL-6 as marker of the proinflammatory cytokine response and IL-10 as a marker of the anti-inflammatory cytokine response; PCT and CRP biomarkers were also analyzed. The blood obtained was placed in tubes containing EDTA, immediately centrifuged, and stored at -80°C . Cytokines were measured by flow cytometry using the cytometric bead arrays technology. Samples were analyzed using a BD FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), according to manufacturer's instructions. Samples were analyzed in duplicate. The detection limit was 5 pg/ml for IL-6 and 1 pg/ml for IL-10. PCT levels were measured by electrochemiluminescence immunoassay using the Modular Analytics e170 immunoassay analyzer (Roche Diagnostics), with a detection limit of 0.02 ng/ml. CRP levels were measured using an immunoturbidimetric assay in a Cobas c711 analyzer (Roche Diagnostics), with a detection limit of 1 mg/L.

Microbiological studies

The isolates were identified and tested for antimicrobial susceptibility by a MicroScan automated microdilution system using CN1S and CO1S panels (Dade International, West Sacramento, CA). The following antimicrobial agents

were tested: aztreonam, ceftazidime, cefepime, piperacillin, piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, levofloxacin, ciprofloxacin, colistin, and fosfomycin. Clinical categories were determined according to the CLSI breakpoints.

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as the mean \pm SD, medians and interquartile range (IQR). The variables were compared by the two-tailed *t*-test or Mann–Whitney *U*-test. The chi-square test or Fisher's exact test were used to compare categorical variables. Variables with a $p < 0.05$ were considered statistically significant. Cytokine measurements in the different PA phenotypes were compared with non-parametric test (Mann–Whitney *U*-test or Kruskal–Wallis test). A stratified analysis based on the type of infection (*i.e.*, respiratory tract infection and bacteremia) was performed. In addition, as an immunosuppression status may modulate the immune response during the infection, we also carried out a stratified analysis according to the immune status of the patient. Data were analyzed using SPSS version 19.0.

Results*Baseline characteristics of the included population*

The epidemiological characteristics of the patients with PA infection are summarized in Table 1. Sixty-nine episodes of infection were recorded in the 61 patients included. Six patients presented a second episode of infection: five with the same strain isolated in the first episode (two non-MDR and three XDR PA) and one patient with initial MDR

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INFECTION ACCORDING TO PHENOTYPE

Characteristic	Non-MDR PA n=37 (%)	MDR non-XDR PA n=11 (%)	p ^a	XDR PA n=13 (%)	p ^b
Age (mean \pm SD)	67.2 \pm 12.3	58.9 \pm 11.8	0.06	67.3 \pm 17.2	0.98
Male sex	25 (67.6)	9 (81.8)	0.27	9 (69.2)	0.92
Days ICU-infection acquisition [median (IQT)]	14.5 (3.75–31)	14.5 (8.75–35.75)	0.63	8.5 (3.5–15.0)	0.21
SAPS score mean (SD)	42.0 \pm 17.2	41.4 \pm 13.0	0.91	44.3 \pm 9.2	0.66
Charlson index [median (IQT)]	1 (0.75–4)	3 (2–4)	0.18	2 (1.25–4)	0.39
Underlying condition					
Diabetes	7 (19)	1 (10)	0.65	1 (8)	0.66
Chronic lung disease	3 (8)	3 (30)	0.12	3 (23)	0.17
Heart Disease	13 (35)	2 (20)	0.45	5 (38)	0.83
Solid malignancy	6 (16)	3 (30)	0.40	3 (23)	0.67
Hematologic malignancy	1 (3)	1 (10)	0.40	0	—
Chronic renal failure	3 (8)	2 (20)	0.31	1 (8)	0.95
Chronic neurologic disease	3 (8)	3 (30)	0.12	1 (8)	0.72
Cirrhosis	2 (5)	3 (30)	0.07	3 (23)	0.06
Neutropenia	0	0	—	0	—
Immunosuppression	10 (27)	1 (10)	0.40	2 (15)	0.47
Outcome					
Early exitus	6 (16)	1 (10)	0.56	1 (8)	0.40
Overall exitus	7 (19)	1 (10)	0.65	2 (15)	0.56
Days ICU-discharge/exitus [median (IQT)]	53 (26.5–87.25)	59.5 (39.25–86.25)	0.50	68.5 (21.0–87.75)	0.72

^aComparison of non-MDR and MDR non-XDR.

^bComparison non-MDR and XDR.

SD, standard deviation; PA, *P. aeruginosa*; MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant; ICU, intensive care unit; IQT, interquartile range; MODS, multiorgan dysfunction syndrome.

non-XDR infection presented a second episode by non-MDR strain. Only one patient had a third episode of infection, caused by the same XDR PA strain. Forty-eight episodes were respiratory tract infections (three of them with bacteremia) and 18 bloodstream infections. Among the remaining six episodes, three episodes were intra-abdominal infections that required emergency surgery, two episodes were central nervous system infections and one episode was a mediasti-

nitic. A stratified analysis according to the immune status of patients, which could account for a different immune response, did not show significant differences as compared with the overall analysis (data not shown). Higher early mortality was observed in patients with non-MDR PA infections versus MDR PA infections, though the difference was not statistically significant (16% for non-MDR vs. 10% for MDR non-XDR and vs. 8% for XDR PA).

TABLE 2. EPISODES OF *P. AERUGINOSA* INFECTION: CLINICAL AND MOLECULAR INFLAMMATORY RESPONSE

Characteristic	Non-MDR PA n=40 (%)	MDR non-XDR PA n=12 (%)	p ^a	XDR PA n=17 (%)	p ^b
Origin of infection					
High risk origin	38 (95)	10 (83)	0.22	14 (82)	0.12
Unknown	3	0		1	
Respiratory tract	29	10		9	
Abdominal	3	0		3	
Other(s)	3	0		1	-
Low risk origin	2 (5)	2 (17)	0.22	3 (18)	0.12
Vascular catheter	1	2		2	
Urinary tract	0	0		1	
Pancreaticobiliary	1	0		0	
SAPS score [mean (SD)] at infection	47.1±14.8	44.6±12.7	0.60	56.5±17.6	0.04
Bacteremia	8 (20)	3 (25)	0.70	7 (41)	0.09
Initial presentation					
Pitt score [median (IQT)]	3 (2–5.50)	1 (0–1)	0.15	6 (6–6)	0.22
IL-6 [median (IQT)]	360 (44–945)	93 (64–93)	0.50	183 (53–789)	0.78
IL-10 [median (IQT)]	11.7 (0.2–22.7)	13.5 (3.8–13.4)	1.00	11.8 (2.76–19.6)	1.00
Procalcitonin [median (IQT)]	3.75 (1.45–11.1)	0.77 (0.50–0.77)	0.085	2.99 (1.16–18.63)	0.96
CRP [median (IQT)]	241 (67–361)	34 (21–337)	0.194	191 (87–394)	0.95
Sepsis (any severity)	7 (87.5)	2 (66.7)	0.491	6 (85.7)	0.73
48 after bacteremia					
Pitt score [median (IQT)]	0 (0–5.25)	0	—	3.5 (1.5–4.0)	0.91
IL-6 [median (IQT)]	52 (25–167)	60 (22–170)	0.63	36 (25–138)	0.66
IL-10 [median (IQT)]	1.15 (0.2–11.9)	7.7 (3.3–12.9)	0.19	7.21 (0.5–13.2)	1.00
Procalcitonin [median (IQT)]	2.42 (1.2–9.3)	0.83 (0.4–0.9)	0.50	1.39 (0.52–5.81)	0.96
CRP [median (IQT)]	174 (79–298)	43 (17–198)	0.78	84 (51–303)	0.62
Sepsis (any severity)	4 (50)	1 (33)	0.58	5 (83.3)	0.24
Initial clinical presentation					
Sepsis	6 (15)	4 (33)	0.21	0	-
Severe sepsis	8 (20)	1 (8)	0.66	2 (12)	0.70
Shock	9 (22.5)	2 (17)	0.50	11 (65)	0.002
MODS	3 (7.5)	0	—	4 (23.5)	0.18
Initial molecular inflammatory response					
IL-6 [median (IQT)]	77 (34–216)	38 (24–86)	0.15	430 (67–951)	0.02
IL-10 [median (IQT)]	1.3 (0–3.9)	2.7 (0–11.8)	0.41	3.3 (1.5–16.3)	0.02
Procalcitonin [median (IQT)]	0.3 (0.1–1.0)	0.3 (0.1–2.4)	0.70	1.1 (0.6–5.2)	0.008
CRP [median (IQT)]	191 (79–305)	103 (41–184)	0.12	202 (56–332)	0.83
Clinical presentation at 48 hr					
Sepsis	2 (5)	0	—	4 (25)	0.05
Severe sepsis	5 (13)	1 (8)	0.56	6 (37.5)	0.03
Shock	6 (15)	1 (8)	0.47	2 (12.5)	0.57
MODS	2 (5)	1 (8)	0.56	0	—
Molecular inflammatory response at 48 hr					
IL-6 [median (IQT)]	58 (30–104)	19 (15–49)	0.02	86 (31–324)	0.33
IL-10 [median (IQT)]	1.7 (0–7.5)	0.98 (0–6.6)	0.60	2.9 (0.7–7.8)	0.52
Procalcitonin [median (IQT)]	0.2 (0.1–17)	0.3 (0.1–1.1)	0.96	0.9 (0.5–4.1)	0.03
CRP [median (IQT)]	96 (47–256)	44 (28–105)	0.14	124 (41–299)	0.58

^aComparison non-MDR and MDR non-XDR.^bComparison non-MDR and XDR.

IL, interleukin; CRP, C-reactive protein.

INFLAMMATORY RESPONSE IN *P. AERUGINOSA* INFECTION

5

TABLE 3. INFLAMMATORY RESPONSE ACCORDING TO ACUTE ORGAN DYSFUNCTION

	At onset			48 hr		
	No organ dysfunction (n=11)	Organ dysfunction (n=58)	p (n=18)	No organ dysfunction (n=49)	Organ dysfunction	p
IL-6 [median (IQT)]	20 (10.8–52.8)	104 (42.1–435.4)	<0.001	28.1 (12.4–49)	66 (32.1–161.6)	<0.001
IL-10 [median (IQT)]	0.2 (0–1.7)	2.5 (0.06–9)	0.03	1.5 (0–4.2)	2.4 (0–8.3)	0.72
Procalcitonin [median (IQT)]	0.1 (0.06–0.8)	0.5 (0.2–3.2)	0.01	0.3 (0.1–0.7)	0.5 (0.1–1.8)	0.02
CRP [median (IQT)]	62 (22.4–129)	200 (90.7–317)	0.03	74 (20.4–144)	97.4 (44.1–299.5)	0.01

Molecular inflammatory response and severity of acute illness

Cytokine and biomarkers concentrations at presentation. Blood was obtained for assay of cytokine concentrations and markers of inflammation at presentation from 69 infections of the 61 subjects. IL-6, CRP, and PCT levels were detected in all infection episodes analyzed. However, 27.5% (19/69) of IL-10 samples had undetected concentrations. The medians of IL-6 and IL-10 were higher in XDR PA infections than in non-MDR PA infections ($p=0.02$). In addition, the PCT level was also significantly higher in XDR PA infections ($p=0.008$) (Table 2). We also observed a significant number of episodes subsequently developing septic shock ($p=0.002$) in XDR PA infections than in non-MDR PA infections. A trend toward higher MODS in XDR PA versus non-MDR PA infections was found, although the differences were not statistically significant ($p=0.18$). The analysis of the molecular and clinical inflammatory response in bacteremic group is shown in Table 2. No significant differences in the progression to sepsis were observed between PA phenotypes. However, non-MDR and XDR PA strains presented a higher number of bacteremic sepsis patients than MDR non-XDR strains, as it is shown in Table 2. Regarding respiratory tract infections, the median levels of IL-6 were higher in non-MDR PA than in MDR non-XDR PA episodes, with a difference close to statistical significance [69 (36–126) vs. 36 (23–57); $p=0.06$]. The level of PCT was significantly higher in XDR PA than in non-MDR PA [0.92 (0.24–1.80) vs. 0.24 (0.12–0.52); $p=0.05$]. No other statistically significant differences were observed at the onset of the infection in the respiratory infection group.

Cytokine and biomarkers concentrations 48 hr after infection onset. We obtained blood for assay of concentrations of cytokine and inflammation markers 48 hr after presentation from 67 infections (Table 2). Concentrations of IL-10 were

undetected in 26% (18/67) of samples; the other markers of inflammation were detected in all samples. The median level of IL-6 was higher in non-MDR infections than in MDR-non-XDR infections ($p=0.02$), and the level of PCT at 48 hr remained significantly higher in XDR PA infections than in non-MDR PA infections ($p=0.03$). Data regarding the molecular inflammatory response at 48 hr of the infection in bacteremic group are shown in Table 2. Regarding to respiratory infection group, we observed that IL-6 levels remained higher in non-MDR than in MDR non-XDR PA after 48 hr [65 (32–104) vs. 17 (15–30); $p=0.001$]. No other significance differences were observed at 48 hr in this group when comparing the biomarkers levels according to PA phenotypes.

Molecular inflammatory response in acute organ dysfunction and in bacteremic infections

Concentrations of cytokines and other inflammatory markers are presented in Table 3, according to the definition of acute organ dysfunction using the SOFA score. Medians of all parameters were significantly higher in patients who developed acute organ dysfunction at infection onset. These differences between the groups remained significant 48 hr after infection onset, except in the case of IL-10; IL-10 levels remained high at 48 hr but the differences were not significant. We also observed significant differences in the levels of IL-6, IL-10, and PCT at onset between bacteremic and nonbacteremic infections. However, after 48 hr, only PCT levels still presented significant differences (Table 4).

Molecular inflammatory response and outcome

In general, plasma cytokine concentrations were higher in nonsurvivors than survivors; however, these differences did not reach statistical significance in either early mortality (those who died within 5 days) or overall mortality (Table 5). Only PCT levels presented significant differences [median,

TABLE 4. INFLAMMATORY RESPONSE ACCORDING TO BACTEREMIC INFECTION

	At onset			48 hr		
	No bacteremia (n=51)	Bacteremia (n=18)	p (n=51)	No bacteremia (n=18)	Bacteremia	p
IL-6 [median (IQT)]	66 (28.7–199)	202 (61.3–688)	0.03	50.5 (24.8–111.5)	46.2 (25.3–144.6)	0.93
IL-10 [median (IQT)]	1.5 (0–3.3)	12.5 (1.4–21.7)	0.003	1.9 (0–5.5)	4.0 (0.6–12.7)	0.13
Procalcitonin [median (IQT)]	0.3 (0.1–0.9)	3 (0.9–8.8)	<0.001	0.2 (0.1–0.9)	2 (0.5–3.9)	<0.001
CRP [median (IQT)]	137 (75.3–280)	183 (49.6–340)	0.08	84 (38.4–219)	92 (52–296.5)	0.39

TABLE 5. INFLAMMATORY RESPONSE AND OUTCOME

	At onset			48 hr		
	Survivors (n=51)	Nonsurvivors (n=18)	p (n=51)	Survivors (n=18)	Nonsurvivors	p
Early mortality						
IL-6 [median (IQT)]	81 (33.5–281)	120 (44.8–507)	0.44	45 (23.3–95.3)	154 (45.3–483)	0.07
IL-10 [median (IQT)]	1.7 (0–5.7)	7.2 (0.6–16.1)	0.21	1.9 (0–5.4)	9.4 (0.2–38.3)	0.11
Procalcitonin [median (IQT)]	0.4 (0.1–1.6)	2 (0.4–5.7)	0.050	0.3 (0.1–1.2)	2.1 (0.3–3.1)	0.06
CRP [median (IQT)]	137 (66.2–285)	262 (63.2–338)	0.41	89 (36.4–230)	131 (46.5–339)	0.45
Overall mortality						
IL-6 [median (IQT)]	81 (34.5–281)	120 (27.3–441)	0.58	45 (21.1–95.3)	104 (34.3–278)	0.09
IL-10 [median (IQT)]	1.7 (0–5.7)	2.1 (0–16)	0.50	1.9 (0–5.4)	6.3 (0.1–17.6)	0.16
Procalcitonin [median (IQT)]	0.4 (0.1–1.6)	0.8 (0.3–4.9)	0.12	0.3 (0.1–1.2)	1.2 (0.2–2.4)	0.13
CRP [median (IQT)]	125 (66.2–285)	259 (63.2–328)	0.38	89 (36.4–239)	88 (46.3–276)	0.77

IQT: 0.4 (0.1–1.6) between survivors and 2 (0.4–5.7) in nonsurvivors; $p=0.050$] at infection onset. None of the analyzed parameters—cytokines, PCT or CRP—, either at baseline or after 48 hr were related to higher overall mortality (Table 5).

Discussion

The aim of this study was to analyze the profiles of cytokines and other biomarkers in blood of ICU patients with PA infection and to evaluate their associations with the clinical severity of infections, outcome, and the pattern of antimicrobial susceptibility of the different strains.

Systemic cytokine activation was the rule, with predominance of an initial hyperinflammatory phase; the scale of this phase may be conditioned, by many factors including pathogen virulence, bacterial load and host factors.²⁹ In line with previous reports^{13,14} we found a clear, overall relationship between the intensity of the inflammatory response, shown by very high levels of cytokines and biomarkers, and the severity of the initial clinical presentation. The inflammatory response was mainly evident at admission, but some traces remained 48 hr later. This response was observed when patients' severity was classified according to the SOFA score, but particularly in the cases with bacteremia, who presented the highest levels. These findings corroborate previous reports that patients with respiratory tract infections may show lower levels of cytokines in plasma, due to a possible compartmentalized immunological response inside the lung.³⁰

Among the cytokines and biomarkers used in this study, IL-6 and PCT were the most significant indicators of the inflammatory response. Compared with PCT, the sensitivity of CRP was significantly lower. On the other hand, previous reports have indicated that PCT may be a good marker of systemic inflammation and severe forms of sepsis,¹² but not for local infections,³¹ such as pneumonia; therefore, these findings may suggest that a local bacterial infection does not induce significant amounts of PCT.

High levels of proinflammatory cytokines have been correlated with the severity of systemic inflammation and impaired outcome,^{32,33} but the authors of previous studies have emphasized the lack of specificity and note that peak levels may change rapidly without clinical correlation. Higher mortality has also been observed in patients with increasing or persistently high PCT concentrations, although

a recent study showed that single PCT values were not predictive for patients' results.¹² We found higher levels of inflammatory cytokines and biomarkers in nonsurvivors in the early mortality group, but this correlation was quite weak in comparison with the findings of cytokine levels and severity of infection. In fact, PCT was the only biomarker of those studied that showed significant association with early mortality. No significant association was found with overall mortality. All these results show that a variety of factors may condition the outcome of these infections and they do not receive sufficient consideration when only data of blood inflammatory markers are evaluated.

Curiously, the analysis of inflammatory markers according to the antimicrobial susceptibility of the strains involved revealed significantly higher values in patients with XDR PA infections. In fact, a higher score of acute illness at infection onset and a more severe initial clinical presentation were observed in this group of XDR PA infection episodes, which may explain this correlation better than the antimicrobial pattern of resistance by itself. Thus, bacteremic infections were particularly frequent in the XDR PA group, and the levels of markers in these bacteremic patients were especially high.

In fact, we conducted a subanalysis including only bacteremic infections and no significant differences in the molecular inflammatory response were observed when comparing PA phenotypes. Moreover, levels of biomarkers were higher in bacteremic infections caused by non-MDR PA than in those caused by MDR non-XDR and XDR PA strains (Table 2), although no significance differences were observed. Respiratory tract infections were also less frequent in the XDR PA group (53%) than in the other two groups (non-MDR PA: 72.5% and MDR non-XDR group: 83%); as noted above, low levels of cytokines in plasma may be due to a compartmentalized inflammatory response in the lung.³⁰ In addition, there are several factors linked to XDR profile that could have an impact on the inflammatory response. In fact, XDR profiles are linked to defined high-risk clones,³⁴ and these clones are associated with certain biological markers that could well play a role in the inflammatory response.³⁵ Also, XDR high-risk clones show defined type III secretion system genotypes, which could certainly have an impact in the inflammatory response.² Thus, if the association of high marker levels and the XDR PA group is due to clinical factors and not only to microbiological factors, this may also account for the absence in our study of a stronger correlation between

marker levels and outcome. We observed a tendency toward higher early mortality in the non-MDR PA group and in fact, in previous work we found early mortality to be lower in patients with XDR PA bacteremia than in patients with non-MDR PA bacteremia.¹

Our study has several limitations. The first and major limitation is the small number of infections recruited, especially with respect to the analysis of the association between the results of biomarkers and the resistance profile of PA. Calculations to estimate power and sample size, based on the epidemiological data of our hospital, were performed before the prospective recruitment. However, during the period of the study the epidemiology of PA infection changed in our center and we observed less episodes of infection than expected. Sufficient data for statistical analysis might have added statistical power and increased the reliability of the clinical interpretation of the results. Second, our work is a descriptive study of the inflammatory response of patients with PA infection and controls were not included. The use of ICU patients as controls would have improved our study. Third, we measured circulating levels of biomarkers at infection onset and 48 hr afterward, and this may have limited our ability to explore whether more time-sensitive patterns existed. Fourth, as the patients included in our study were critical patients, some of them were under corticosteroid or appropriate antibiotic treatment at the time of the infection onset; a situation that may have altered their cytokine levels.^{6,29} In addition, other treatments and other patient conditions such as age or comorbidities may also have interfered with the results. Finally, extrapolating our findings in PA infections to other types of infection may be risky, because certain studies have shown PCT levels, to be significantly higher in the Gram-negative rod group than in the Gram-positive cocci.³⁶

In conclusion, our study contributes toward a better understanding of the dynamics of biomarkers' inflammatory response in PA infections in ICU patients. A clear association between the intensity of molecular response and the severity of initial clinical presentation was observed. However, it was not clear whether a greater response of inflammatory biomarkers involves a worse prognosis. Inflammatory response was considerably higher in patients with bacteremia than in those with respiratory tract infections. Regarding the antimicrobial susceptibility of PA strains, no differences were documented in mortality between XDR and non-MDR PA. XDR PA infection presented higher values of inflammatory markers, but a greater number of bloodstream infections in this group may explain these results; thus should be interpreted carefully. Further investigation is needed to elucidate the clinical implications of these findings.

Acknowledgments

The authors would like to thank Michael Maudsley (Language Advisory Service, University of Barcelona) for revising the English of this article. Funding: This study was supported by National Health Service grant FIS 11/00164 from the Fondo de Investigación Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, and co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF) "a way to build Europe" and by the Ciber de Enfermedades Respiratorias (CB06/06/0037).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Peña, C., C. Suarez, M. Gozalo, J. Murillas, B. Almirante, V. Pomar, M. Aguilar, A. Granados, E. Calbo, J. Rodríguez-Baño, F. Rodríguez, F. Tubau, L. Martínez-Martínez, and A. Oliver; Spanish Network for research in Infectious Diseases REIPI. 2012. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1256–1272.
- Peña, C., G. Cabot, S. Gómez-Zorrilla, L. Zamorano, A. Ocampo-Sosa, J. Murillas, B. Almirante, V. Pomar, M. Aguilar, A. Granados, E. Calbo, J. Rodríguez-Baño, F. Rodríguez-López, F. Tubau, L. Martínez-Martínez, and A. Oliver; Spanish Network for Research in Infectious Diseases REIPI. 2015. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin. Infect. Dis.* 60:539–548.
- Peña, C., S. Gómez-Zorrilla, I. Oriol, F. Tubau, M.A. Dominguez, M. Pujol, and J. Ariza. 2013. Impact of multidrug resistance on *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia outcome: predictors of early and crude mortality. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32:413–420.
- Chamot, E., E. Boffi El Amari, P. Rohner, and C. Van Delden. 2003. Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2756–2764.
- Kang, C.I., S.H. Kim, H.B. Kim, S.W. Park, Y.J. Choe, M.D. Oh, E.C. Kim, and K.W. Choe. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: risk factors for mortality and influence of delayed of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin. Infect. Dis.* 37:745–751.
- Van der Poll, T. 2001. Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect. Dis.* 1:165–174.
- Ulloa, L., and K.J. Tracey. 2005. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol. Med.* 11:56–63.
- Osuchowski, M.F., J. Connett, K. Welch, J. Granger, and D.G. Remick. 2009. Stratification is the key: inflammatory biomarkers accurately direct immune-modulatory therapy in experimental sepsis. *Crit. Care Med.* 37:1567–1573.
- Remick, D.G., G.R. Bolgos, J. Siddiqui, J. Shin, and J.A. Nemzek. 2002. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock.* 17:463–467.
- Simon, L., F. Gauvin, D.K. Amre, P. Saint-Louis, and J. Lacroix. 2004. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systemic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 39:206–217.
- Reinhart, K., M. Bauer, N.C. Riedemann, and C.S. Hartog. 2012. New approaches to sepsis: molecular diagnosis and biomarkers. *Clin. Microbiol. Rev.* 25:609–634.
- Karlsson, S., M. Heikkinen, V. Pettila, S. Alila, S. Vaisanen, K. Pulkki, E. Kolho, and E. Ruokonen; Finnsepsis Study Group. 2010. Predictive value of procalcitonin decrease in patients with severe sepsis: a prospective observational study. *Crit. Care* 14:R205.
- Fernández-Serrano, S., J. Dorca, M. Coromines, J. Carratalá, F. Gudiol, and F. Manresa. 2003. Molecular inflammatory responses measured in blood of patients with severe community-acquired pneumonia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:83–820.

14. Endeman, H., S.C. Meijvis, G.T. Rijkers, H. van Velzen-Blad, C.H. van Moorsel, J.C. Grutters, and D.H. Biesma. 2011. Systemic cytokine response in patients with community-acquired pneumonia. *Eur. Respir. J.* 37:1431–1438.
15. Menéndez, R., J.M. Sahuquillo-Arce, S. Reyes, R. Martínez, E. Polverino, C. Cillóniz, J.G. Córdoba, B. Montull, and A. Torres. 2012. Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microrganisms in community-acquired pneumonia. *Chest* 141:1537–1545.
16. Kellum, J.A., L. Kong, M.P. Fink, L.A. Weissfeld, D.M. Yealy, M.R. Pinsky, J. Fine, A. Krischevsky, R.L. Delude, and D.C. Angus; GenIMS Investigators. 2007. Understanding the inflammatory cytokine response in Pneumonia and sepsis: results of the genetic and inflammatory markers of sepsis (GenIMS) study. *Arch. Intern. Med.* 167:1655–1663.
17. Muenzer, J.T., C.G. Davsi, K. Chang, R.E. Schmidt, W.M. Dunne, C.M. Coopersmith, and R.S. Hotchkiss. 2010. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect. Immun.* 78:1582–1592.
18. Giamarellos-Bourboulis, E.J., D. Plachouras, A. Tzivra, V. Kousoulas, N. Bolanos, M. Raftogiannis, I. Galani, I. Dontas, A. Dionysiou-Asteriou, and H. Giamarellou. 2004. Stimulation of innate immunity by susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, an in vitro and in vivo study. *Clin. Exp. Immunol.* 135:240–246.
19. Sibila, O., C. Agusti, A. Torres, S. Baquero, S. Gando, J.R. Patron, J.G. Morato, D.H. Goffredo, N. Bassi, and C.M. Luna. 2007. Experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia: evaluation of the associated inflammatory response. *Eur. Resp. J.* 30:1167–1172.
20. Gómez-Zorrilla, S., M. Camoez, F. Tubau, E. Periche, R. Cañizares, M.A. Dominguez, J. Ariza, and C. Peña. 2014. Antibiotic pressure is a major risk factor for rectal colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:5863–5870.
21. Charlson, M.E., P. Pompei, K.L. Ales, and C.R. MacKenzie. 1987. A new method of classifying prognostic co-morbidity in longitudinal studies: development and validation. *J. Chronic Dis.* 40:373–383.
22. Le Gall, J.R., P. Loirat, A. Alperovitch, P. Glaser, C. Granthil, D. Mathieu, P. Mercier, R. Thomas, and D. Vilers. 1984. A simplified acute physiologic score for ICU patients. *Crit. Care Med.* 12:975–977.
23. Garner, J.S., W.R. Jarvis, T.G. Emori, T.C. Horan, and J.M. Hughes. 1988. CDC definitions for nosocomial infections. *Am. J. Infect. Control* 16:128–140.
24. Pugin, J., R. Auckenthaler, N. Mili, J.P. Janssens, P.D. Lew, and P.M. Suter. 1991. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic “blind” bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:1121–1129.
25. Chow, J.W., M.J. Fine, D.M. Shlaes, J.P. Quinn, D.C. Hooper, M.P. Johnson, R. Ramphal, M.M. Wagener, D.K. Miyashiro, and V.L. Yu. 1991. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann. Intern. Med.* 115:585–590.
26. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* 20:864–874.
27. Vincent, J.L., R. Moreno, J. Takala, S. Willatts, A. De Mendonça, H. Bruining, C.K. Reinhart, P.M. Suter, and L.G. Thijs. 1996. The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med.* 22:707–710.
28. Magiorakos, A.P., A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, and D.L. Monnet. 2012. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268–281.
29. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen. 2013. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* 13:260–268.
30. Dehoux, M.S., A. Boutten, J. Ostinelli, N. Seta, M.C. Dombret, B. Crestani, M. Deschenes, J.L. Trouillet, and M. Aubier. 1994. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:710–716.
31. Pupelis, G., N. Drozdova, M. Mukans, and M. Malbrain. 2014. Serum procalcitonin is a sensitive marker for septic shock and mortality in secondary peritonitis. *Anaesthesiol. Intensive Ther.* 46:262–273.
32. van Langevelde, P., K. Joop, J. van Loon, M. Frölich, P.H. Groeneveld, R.G. Westendorp, and J.T. van Dissel. 2000. Endotoxin, cytokines, and procalcitonin in febrile patients admitted to the hospital: identification of subjects at high risk of mortality. *Clin. Infect. Dis.* 31:1343–1348.
33. Jekarl, D.W., S.Y. Lee, J. Lee, Y.J. Park, Y. Kim, J.H. Park, J.H. Wee, and S.P. Choi. 2013. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75:342–347.
34. Cabot, G., A.A. Ocampo-Sousa, M.A. Dominguez, J.F. Gago, C. Juan, C. Rodriguez, B. Moyà, C. Peña, L. Martínez-Martínez, and A. Oliver; Spanish Network for Research in Infectious Diseases REIPI. 2012. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:6349–6357.
35. Mulet, X., G. Cabot, A.A. Ocampo-Sousa, M.A. Dominguez, L. Zamorano, C. Juan, F. Tubau, C. Rodríguez, B. Moyà, C. Peña, L. Martínez-Martínez, and A. Oliver; Spanish Network for Research in Infectious Diseases REIPI. 2013. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:5527–5535.
36. Nakajima, A., J. Yazawa, D. Sugiki, M. Mizuguchi, H. Sagara, M. Fujisiro, M. Shibazaki, A. Hitani, M. To, and M. Haruki. 2014. Clinical Utility of procalcitonin as a marker of sepsis: a potential predictor of causative pathogens. *Intern. Med.* 53:1497–1503.

Address correspondence to:
 Carmen Peña, PhD
 Infectious Diseases Service
 Hospital de Bellvitge-IDIBELL
 Feixa Llarga s/n
 L'Hospitalet de Llobregat
 Barcelona 08907
 Spain

E-mail: cpena@bellvitgehospital.cat

Impact of multidrug resistance on *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia outcome: predictors of early and crude mortality

C. Peña · S. Gómez-Zorrilla · I. Oriol · F. Tubau ·
M. A. Dominguez · M. Pujol · J. Ariza

Received: 14 August 2012 / Accepted: 2 October 2012 / Published online: 24 January 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract The prevalence of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* has increased over the past decade and a significant rise in these isolates in ventilator-associated pneumonia (VAP) has been observed. However, the impact of MDR on VAP outcome has not been analysed in depth. We investigated the risk factors for early and crude mortality in a retrospective study of microbiologically and clinically documented VAP. Ninety-one VAP episodes in 83 patients were included, 31 caused by susceptible *P. aeruginosa* and 60 by MDR strains, of which 42 (70 %) were extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa*. Thirteen episodes concomitantly presented *P. aeruginosa* bacteraemia, in seven of which the origin was the respiratory tract. Whereas susceptible *P. aeruginosa* episodes were more likely than MDR episodes to receive adequate empirical (68 % vs. 30 %; $p < 0.001$) and definitive antimicrobial therapy (96 % vs. 50 %; $p < 0.001$), susceptible *P. aeruginosa* VAP presented a trend towards early mortality (29 % vs. 15 %; $p = 0.06$). A logistic regression model with early mortality as the dependent variable identified multiorgan dysfunction syndrome (MODS) [odds ratio (OR) 10.4; 95 % confidence interval (CI) 1.7–63.5; $p = 0.01$] and inadequate antibiotic therapy (OR 4.27; 95 % CI 0.98–18.4; $p = 0.052$) as independent risk factors for early mortality. A similar analysis identified MODS (OR 4.31; 95 % CI 1.14–16.2; $p = 0.03$) as the only independent predictor of crude mortality. The severity of acute illness clinical presentation

was the main predictor of mortality. Despite adequate antibiotic therapy, susceptible *P. aeruginosa* seems to cause major early mortality. Although adequate therapy is essential to treat VAP, the severity of acute illness is a more important factor than drug resistance.

Introduction

Intubation with mechanical ventilation increases the risk of lower respiratory tract infections, and is associated with crude mortality rates of 30–70 % [1]. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main species implicated in the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia (VAP), and the emergence of *P. aeruginosa* strains which exhibit co-resistance to almost all antibiotic classes is growing. The presence of multidrug-resistant (MDR) strains diminishes the treatment options and increases the risk of inadequate empirical therapy.

Guidelines for the management [1] of VAP emphasised the importance of early, adequate, empirical antibiotic therapy based on patient risk factors for infection due to MDR pathogens. Potential disadvantages include excessive use of multiple empirical antibiotic therapy, which may increase antibiotic resistance, toxicity and failure to properly de-escalate when culture data become unavailable.

Multiple antibiotic therapy is commonly administered in cases of suspected or proven *P. aeruginosa* infections, especially hospital-acquired pneumonia (HAP). However, this strategy remains controversial, since the administration of one effective antibiotic therapy achieves similar mortality rates [2, 3]. In fact, it is well known that mortality in these patients is influenced at least as much by their underlying condition as by the organism itself [4, 5]. Several studies have shown an increase in mortality with a delay in adequate antibiotics [6–8], but others have failed to find a

C. Peña (✉) · S. Gómez-Zorrilla · I. Oriol · M. Pujol · J. Ariza
Infectious Diseases Service, IDIBELL,
Hospital Universitari de Bellvitge,
C/ Feixa Llarga S/n., L'Hospitalet de Llobregat,
08907 Barcelona, Spain
e-mail: cpena@bellvitgehospital.cat

F. Tubau · M. A. Dominguez
Microbiology Service, IDIBELL,
Hospital Universitari de Bellvitge,
Barcelona, Spain

significant difference in mortality when patients received inadequate therapy [9–11]. Furthermore, a recent prospective study [12] suggested that the deleterious effect of the antimicrobial resistance in *P. aeruginosa* may be not as great during the first days of the bacteraemia. It is very important to clarify prognostic factors related to antimicrobial resistance because they may help guide the recommended empirical antibiotic policy in the setting of MDR *P. aeruginosa*. If a delay in adequate antibiotic therapy does not have decisive consequences in most of these patients, then the indiscriminate use of empirical colistin could be avoided, along with the consequent risk of increasing resistance to this drug.

The prevalence of MDR *P. aeruginosa* has increased over the past decade. Nonetheless, and despite a significant rise in these MDR *P. aeruginosa* isolates in VAP infections, few studies of this issue have been published. While the risk factors for MDR organisms [13, 14] or antibiotic treatment of VAP [15] have aroused the interest of clinicians, to our knowledge, few studies have quantified the effect of MDR *P. aeruginosa*, and the possible effect of delaying adequate antimicrobial treatment, on mortality.

A progressive increase in the number of MDR *P. aeruginosa* isolates has been observed in our hospital in an epidemiological setting of a sustained endemic outbreak [16]. We designed a retrospective study among patients with ventilator-associated lower respiratory tract infections, with the main objective of investigating the risk factors for early and crude mortality. We also analysed the impact of multidrug resistance on VAP outcome and compared the epidemiological characteristics of VAP caused by susceptible *P. aeruginosa* and those caused by MDR *P. aeruginosa*.

Materials and methods

Study design

A retrospective study was performed at Hospital de Bellvitge, a tertiary-care university hospital between January 2006 and December 2011. All patients selected met the following criteria: positive results of quantitative culture of specimens from bronchoalveolar lavage (BAL) and microbiologic confirmation of quantitative monomicrobial cultures with a *P. aeruginosa* bacterial count of 1×10^5 colony-forming units (CFU)/mL in BAL fluid specimen [1]. HAP was defined according to the Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS) [17] and a score ≥ 6 , indicating the presence of respiratory tract infection, was the condition for inclusion.

The following data were recorded: age and sex; comorbidities (diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease, heart failure, chronic renal failure, hepatic dysfunction, haematologic and solid malignancy, neurologic disease

and immune deficiency disease) and severity of underlying diseases calculated using the Charlson comorbidity index [18]; the presence of neutropaenia (absolute granulocyte count of $<500/\text{ml}$) and the use of immunosuppressive therapy (chemotherapy, radiotherapy and/or immunosuppressive drugs) during the 30 days prior to VAP presentation; the presence of septic shock, multiorgan dysfunction syndrome (MODS) at VAP presentation [19]; and antimicrobial treatment received. The severity of illness was estimated by the Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) at intensive care unit (ICU) admission and at sample collection [20]. The length of hospitalisation prior to the collection of *P. aeruginosa* culture sample and mechanical ventilation at the time of the culture sample were also recorded.

Definitions

HAP is defined as the development of parenchymal lung infection after at least 48 h of hospitalisation. The infection develops after the patient has undergone intubation and received mechanical ventilation for at least 48 h; the condition is termed VAP. Ventilator-associated tracheobronchitis (VAT) is a clinical syndrome similar to VAP, but with no radiographic infiltrate present [21]. VAP and VAT were established according to clinical diagnosis and the collection of a deep respiratory tract sample for culture in order to establish an aetiological pathogen. The diagnosis of HAP is made in the case of a CPIS ≥ 6 indicating the presence of respiratory tract infection based on criteria of fever, elevated white blood cell count, purulent appearance of respiratory secretions, radiographic findings and growth of pathogens on a lower respiratory tract culture [17]. Bacteraemia of origin other than the respiratory tract was considered when it occurred more than 72 h after VAP diagnosis.

Delay in adequate antimicrobial therapy was defined as the time from VAP until administration of the empirical or definitive adequate therapy. Empirical therapy was considered when an antimicrobial regimen was administered within 24 h of VAP diagnosis and before susceptibility was known; therapy administered after this time was considered to be definitive. Antimicrobial therapy was considered adequate when the *P. aeruginosa* isolate was susceptible to the antimicrobial prescribed. Combination therapy was defined as adequate if the strain was susceptible to both antipseudomonal drugs given simultaneously. Aminoglycoside monotherapy and inhaled colistin alone were considered inadequate treatment for *P. aeruginosa* VAP. In addition, piperacillin–tazobactam treatment was considered inadequate when the strain showed a minimum inhibitory concentration (MIC) in the range 32–64 mg/L in accordance with the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria [22] and the new breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [23].

Clinical outcome was classified as follows: (i) clinical cure: resolution of presenting symptoms and signs of infection by the end of antibiotic treatment; (ii) clinical improvement: partial resolution of presenting symptoms and signs of infection; (iii) clinical failure: persistence or worsening of presenting symptoms and signs of infection during the treatment; and (iv) recurrence of infection: occurrence of a new episode of infection at least 72 h after the clinical resolution of a preceding episode.

Microbiological outcome was classified as: (i) eradication: no growth of the pathogen in the final culture of specimens during the entire hospitalisation; (ii) persistence of pathogen: persistent growth of the responsible pathogen regardless of the clinical outcome of the infection; and (iii) recurrence of the pathogen: regrowth of the same pathogen regardless of the clinical outcome of the infection.

Early mortality was defined as death within the 7 days of VAP onset; crude mortality was considered as death during the hospitalisation.

Microbiological data

Microbiological data included all positive *P. aeruginosa* BAL and blood samples. Microbiological data on other organisms causing bloodstream infections at a distal site were also documented. *P. aeruginosa* strains were identified and tested for antimicrobial susceptibility by a MicroScan automated microdilution system using CN1S and CO1S panels (Dade International, West Sacramento, CA, USA). CLSI criteria [23] were used to define susceptibility or resistance to these antimicrobial agents. The antibiotics tested were: piperacillin–tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, ofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, colistin and fosfomycin. Intermediate results were considered to be resistant.

In accordance with recent standard definitions [24], MDR *P. aeruginosa* was defined as a strain non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antipseudomonal antimicrobial categories. Extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* was defined as non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 antipseudomonal antimicrobial categories; thus, an XDR *P. aeruginosa* isolate was also included as MDR *P. aeruginosa*. All other *P. aeruginosa* isolates, including those non-susceptible to ≥ 1 agent in < 3 antimicrobial categories, were considered to be non-MDR strains. MDR and XDR *P. aeruginosa* were defined considering the previously indicated agents.

Statistical analysis

Student's *t*-test was used to compare continuous variables. The Chi-square test or Fisher's exact test was used to compare categorical variables. Logistic regression analysis was used to identify the independent risk factors for VAP

P. aeruginosa outcome. Variables with a $p < 0.05$ in the univariate analysis and those found in previous studies were included in the multivariate model. Data were analysed using the statistical software SPSS, version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Epidemiological and clinical features

We identified 120 episodes of ventilator-associated lower respiratory tract infections for a microbiologically documented *P. aeruginosa* infection during the study period. Of these episodes, 29 were excluded from further analysis because they did not have a clinical lower respiratory tract infection according to the CPIS. Ninety-one episodes in 83 patients with a mean of CPIS of 8.96 (range 6 to 14) were analysed. Six patients experienced a second VAP episode and one a third episode. There were four recurrences of the initial VAP, all caused by XDR *P. aeruginosa* strains; in the remaining four episodes, the initial and subsequent *P. aeruginosa* strains isolated from the respiratory tract from the same patients showed different susceptibility profiles; the intervals between the first and second episodes were 21, 18, 29 and 58 days, respectively. Three patients were classified as VAT; here, we use the terms VAP and ventilator-associated respiratory tract infection interchangeably.

Of the 83 patients, 65 (78 %) were male and the mean age was 69.39 ± 14.15 years. The mean length of ICU admission to VAP was 24.93 ± 22.0 days and the mean time from mechanical ventilation to VAP was 19.06 ± 18.1 days.

Among the 91 VAP episodes, 60 were caused by MDR *P. aeruginosa*, of which 42 (70 %) were XDR strains. Thirteen VAP episodes concomitantly presented *P. aeruginosa* bacteraemia; in seven, the source was the respiratory tract [7] and the remaining six were primary bacteraemias (catheter vascular and unknown origin). Five other bloodstream infections were detected during the VAP clinical evolution: two *Klebsiella pneumoniae* episodes, one *Escherichia coli*, one *Enterococcus faecalis* and one *E. faecium*.

Among the 60 MDR episodes, 11 received intravenous (i.v.) colistin. In all but one, the isolates of MDR *P. aeruginosa* from respiratory specimens were due to XDR strains. Four of the 11 patients survived and in two, the dosage of colistin was adequate; the remaining seven patients died and only two patients received adequate doses of i.v. colistin. None of these deaths occurred within 7 days of VAP onset. In addition, inhaled colistin was administered in 48 (80 %) MDR episodes.

Thirty (50 %) of the MDR *P. aeruginosa* episodes received inadequate definitive therapy, 24 (80 %) of which were caused

by XDR strains. Ten XDR episodes received piperacillin–tazobactam, according to the prior CLSI susceptibility range; nine received antimicrobials (three carbapenems, four anti-pseudomonal cephalosporins, two fluoroquinolones) with intermediate range of activity; and the remaining five episodes received inhaled colistin alone.

The epidemiological and clinical characteristics of the VAP episodes according to the susceptibility of the *P. aeruginosa* strain are shown in Table 1. Among the 91 VAP episodes, the median days to ICU admission from VAP onset was significantly higher in patients with MDR strains, as was the interval of days between the start of mechanical ventilation and VAP diagnosis. Patients in the non-MDR strain VAP group were more likely than those in the MDR group to receive adequate empirical (68 % vs. 30 %; $p<0.001$) and definitive antimicrobial therapy (96 % vs. 50 %; $p<0.001$). We also observed a trend towards early mortality in susceptible *P. aeruginosa* VAP (29 % vs. 15 %; $p=0.06$). The microbiological outcome was better in non-MDR episodes but did not reach statistical significance.

Outcome

Early mortality

Eighteen patients died during the 7 days after VAP onset. The unadjusted analyses for the association of the characteristics with mortality are shown in Table 2. A logistic regression model with early mortality as a dependent variable, adjusted for age, sex, severity of illness, bacteremic VAP, shock, MODS and adequate empirical antibiotic treatment, identified MODS [odds ratio (OR) 10.4; 95 % confidence interval (CI) 1.7–63.5; $p=0.011$] and adequate antibiotic treatment (OR 4.27; 95 % CI 0.98–18.4; $p=0.052$) as independent risk factors for early mortality.

Crude mortality

Forty-seven patients died during hospitalisation [17 (55 %) susceptible group vs. 30 (50 %) MDR group; $p=0.33$] (Table 3). Severity of acute illness and clinical presentation were the variables associated with crude mortality. We also observed a trend towards an association between crude mortality and severity of illness at ICU admission ($p=0.06$). A logistic regression model with crude mortality as the dependent variable, adjusted for age, sex, severity of illness, shock and MODS, identified MODS (OR 4.31; 95 % CI 1.14–16.2; $p=0.03$) as the only independent risk factor for crude mortality. Adjusted analysis with adequate empirical or definitive antimicrobial therapy did not modify the model.

Discussion

Multiple reports over the last decade have alerted on the increase of MDR *P. aeruginosa* strains in hospitals worldwide, mainly in ICUs. In this study, MDR *P. aeruginosa* was frequently identified, with an overall prevalence in respiratory tract infections of 66 %. This high prevalence may be attributed to the epidemiological problem observed in our hospital during the study period [16].

In this series, VAP caused by MDR *P. aeruginosa* had longer duration of mechanical ventilation, longer ICU stay, higher rate of underlying disease and a longer delay in adequate antimicrobial therapy administration, but it was not followed by significant differences in clinical response and crude mortality. In fact, the impact of drug resistance on the outcome of VAP remains controversial; some [6, 25], but not all, studies [26–27] find a relationship between poorer clinical outcome and the presence of resistant organisms.

Conversely, a trend towards early mortality linked to susceptible *P. aeruginosa* respiratory tract infections (29 % vs. 15 %; $p=0.06$) was observed. In fact, empirical antimicrobial therapy and treatment in the first 24 h were seen to be adequate in VAP episodes with early mortality (67 % vs. 36 %), suggesting that patients who have comorbidities and are severely ill at the time of VAP diagnosis are at a high risk of treatment failure, despite receiving adequate antibiotic therapy [28]. A plausible explanation for the association between susceptible strains and worse early mortality is that, hypothetically, they are more virulent than their drug-resistant counterparts [29]. Although we did not observe significant differences in clinical presentation between the two phenotype groups, we cannot rule out the possibility that unmeasured factors predispose to a major deleterious effect in susceptible strains.

The crude mortality rate for HAP may be as high as 70 %, but many of these critically ill patients with HAP die of their underlying disease rather than from pneumonia [4]. In our study, MODS clinical presentation was the only predictor for crude mortality. In fact, previous clinical studies have identified severity of illness at the moment of diagnosis or the development of shock or/and MODS during clinical presentation as key prognostic factors [30, 31]. Thus, our results do not support the idea that VAP caused by MDR *P. aeruginosa* is associated with worse clinical outcome due to inadequate antimicrobial therapy. While these findings challenge those of certain studies [6–8], surprisingly, other reports [9–11] also failed to find any difference in mortality when evaluating this variable in a group of VAP due to *P. aeruginosa* strains susceptible only to colistin.

Regarding definitive treatment, several aspects of our series should be noted. A high number of our patients, indeed, received inadequate definitive treatment, because

Table 1 Baseline characteristics of patients with *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia (VAP)

Characteristic	Non-MDR PA, n=31 (34 %)	MDR-PA, n=60 (66 %)	p-value
Age (mean±SD)	55.84±15.56	62.9±12.3	0.02
Male sex	25 (81)	44 (73)	0.44
ICU admission to VAP (days, median, IQR)	11 (7–22)	26 (13–45)	0.01
MV to VAP (days, median, IQR)	10 (5–17)	17 (9–43)	0.03
VAP <i>P. aeruginosa</i> bacteraemia	2 (6.5)	5 (8)	1.0
Non-VAP <i>P. aeruginosa</i> bacteraemia	3 (10)	3 (5.5)	0.41
Other organisms bacteraemia	1 (3)	4 (7)	0.65
Charlson index (median, IQR)	1 (1–4)	2 (1–3.75)	0.07
Underlying condition			
Any	18 (58)	51 (85)	0.004
Solid malignancy	4 (13)	17 (28)	0.12
Haematologic malignancy	2 (6.5)	4 (7)	1.0
Diabetes	4 (13)	20 (33)	0.04
Cardiopathy	6 (19)	14 (23)	0.66
COPD	8 (25)	18 (30)	0.67
Chronic renal failure	2 (6.5)	7 (12)	0.71
Neurologic disease	3 (10)	10 (17)	0.53
Cirrhosis	1 (3)	6 (10)	0.41
Neutropaenia	1 (3)	0	–
Immunosuppressive therapy	4 (13)	25 (42)	0.008
SAPS score on admission (mean±SD)	40.23±13.2	39.05±13.03	0.68
Prior aerosolised colistin	1 (3)	21 (35)	0.001
Prior parenteral colistin	0	3 (5)	–
Clinical presentation			
Shock	17 (55)	29 (48)	0.27
MODS	7 (23)	18 (30)	0.45
SAPS score at diagnosis (mean±SD)	57.19±9.03	53.83±14.1	0.23
Antimicrobial empiric therapy	31 (100)	57 (95)	0.20
Adequate empiric therapy	21 (68)	17 (30)	<0.001
Adequate combined therapy	10 (33)	4 (7)	0.004
Antimicrobial definitive therapy	28 (90)	60 (100)	0.01
Adequate definitive therapy	27 (96)	30 (50)	<0.001
Delay in adequate treatment (mean±SD)	1.28±0.45	1.69±0.46	<0.001
Clinical outcome			
Clinical cure	12 (39)	27 (45)	0.28
Clinical improvement	7 (23)	6 (10)	0.06
Clinical failure	12 (39)	23 (38)	0.48
Recurrence	0	4 (7)	–
Microbiological outcome			
Eradication	9 (38)	11 (23)	0.17
Persistence	14 (58)	36 (75)	0.24
Recurrence	0	1 (2)	–
Outcome			
Early mortality	9 (29)	9 (15)	0.06
Crude mortality	17 (55)	30 (50)	0.33

Adequate empiric and/or definitive treatment excluded 24 episodes that did not receive empiric nor definitive treatment
 Microbiological outcome included 23 episodes of non-MDR VAP and 48 episodes of MDR VAP
PA Pseudomonas aeruginosa; *SD* standard deviation; *IQR* interquartile range; *MV* mechanical ventilation; *COPD* chronic obstructive pulmonary disease; *SAPS* Simplified Acute Physiology Score; *MODS* multiorgan dysfunction syndrome

around 50 % of MDR episodes were treated with inhaled colistin and piperacillin–tazobactam, which are currently

considered to be inadequate, but were within the susceptible range according to earlier CLSI criteria. Similarly, although

Table 2 Risk factors for early mortality in *P. aeruginosa* VAP: univariate analysis

Characteristic	Survived, <i>n</i> =73 (%)	Died, <i>n</i> =18 (%)	<i>p</i> -value
Age (mean±SD)	60.7±13.3	59.6±16.2	0.77
Male sex	54 (74)	15 (83)	0.54
VAP <i>P. aeruginosa</i> bacteraemia	3 (4)	4 (22)	0.026
Non-VAP <i>P. aeruginosa</i> bacteraemia	5 (7)	1 (7)	1.0
Other organisms bacteraemia	2 (3)	3 (17)	0.051
MDR <i>P. aeruginosa</i>	51 (70)	9 (50)	0.11
Charlson index (mean±SD)	2.2±1.91	2.6±2.27	0.45
Underlying condition	54 (74)	15 (83)	0.40
SAPS score on admission (mean±SD)	37.4±12.1	47.61±13.8	0.003
Clinical presentation			
Shock	30 (41)	16 (89)	<0.001
MODS	12 (16)	13 (72)	<0.001
SAPS score at diagnosis (mean±SD)	52.3±11.8	65.5±10.3	<0.001
Adequate empiric therapy	26 (36)	12 (67)	0.017
Adequate combined therapy	9 (13)	5 (28)	0.12
Adequate definitive therapy	46 (63)	11 (73)	0.44
Adequate therapy in first 24 h	29 (40)	12 (67)	0.040

the efficacy of colistin has been reported in several series of pneumonia [15], intravenous colistin was administered in only 11 (18 %) VAP episodes. In addition, according to pharmacokinetics/pharmacodynamics studies, the dosage regimens were suboptimal in all but four episodes; moreover, aerosolised colistin was added as adjunctive therapy to other antimicrobials for the treatment of VAP in 80 % of the MDR episodes. The effectiveness of inhaled colistin as monotherapy in 11 of the 21 XDR episodes who survived may be indicative of the clinical benefit of this mode of administration.

Despite the high prevalence of MDR and XDR strains in our hospital, these data merely reflect the fact that colistin was not considered as the first-line therapy, and that a delayed onset of colistin treatment did not entail worse prognosis. These findings could be useful to strengthen the design of empirical antibiotic strategies, reducing colistin consumption and, therefore, reducing the risk of developing resistance. It seems advisable to reserve colistin for use as definitive therapy in critical patients with VAP due to MDR and XDR *P. aeruginosa* isolates.

Table 3 Risk factors for crude mortality in *P. aeruginosa* VAP: univariate analysis

Characteristic	Survived, <i>n</i> =44 (%)	Died, <i>n</i> =47 (%)	<i>p</i> -value
Age (mean±SD)	60.7±13.7	60.36±14.0	0.09
Male sex	30 (68)	39 (83)	0.44
VAP <i>P. aeruginosa</i> bacteraemia	2 (4.5)	5 (11)	0.43
Non-VAP <i>P. aeruginosa</i> bacteraemia	2 (4.5)	4 (9)	0.67
Other organisms bacteraemia	0	5 (11)	–
MDR <i>P. aeruginosa</i>	30 (68)	30 (62.5)	0.66
Charlson index (mean±SD)	2.0±1.89	2.57±2.05	0.16
Underlying condition	31 (70.5)	39 (81)	0.24
SAPS score on admission (mean±SD)	36.82±13.1	41.91±12.60	0.06
Clinical presentation			
Shock	16 (36)	30 (64)	0.009
MODS	5 (11)	20 (43)	0.001
SAPS score at diagnosis (mean±SD)	52.30±12.3	57.49±12.6	0.050
Adequate empiric therapy	18 (41)	20 (43)	0.87
Adequate combined therapy	5 (12)	9 (20)	0.28
Adequate definitive therapy	28 (64)	29 (66)	0.82
Adequate therapy in first 24 h	20 (45.5)	21 (44)	0.86

The present study has the inherent limitations of a retrospective analysis and the sample size is rather small for some comparisons. However, to evaluate the predictors for mortality, we adjusted for confounding variables such as severity of illness at the moment of diagnosis, severity of clinical presentation or the presence of bacteraemia, factors which were associated with fatality in previous studies. SAPS II provides outcome prediction scores that share many variables in their calculation, and the use of this score and the severity of clinical presentation (shock and MODS) in the same model may cause collinearity problems in the interpretation of the results. Due to this potential collinearity problem, and after repeating the analysis with different combinations, only shock and MODS are included in the final analysis. Finally, the inferences that can be made from our data may be limited, since previous data indicate clonal involvement in the XDR phenotype [16]; moreover, a recent study [12] showed that the major XDR clone involved in our hospital was widely disseminated in Spanish hospitals and, likely, other countries. Thus, we believe that these results are applicable to other settings.

In conclusion, this is one of the largest series of mono-microbial *P. aeruginosa* VAP reported to date, with a high prevalence of MDR strains. We found that multidrug resistance does not adversely affect the outcome for patients with VAP. While the adequacy of empirical antimicrobial therapy is, of course, very important in the early outcome of patients with VAP, episodes caused by susceptible *P. aeruginosa* strains seem to have major early mortality, despite more frequently receiving adequate empirical therapy. This information on the implications of resistance for patient outcome suggests that it may be wiser to focus on improving the haemodynamic support sepsis, and may also guide antibiotic policy by allowing a more judicious use of the few antimicrobial options available. Finally, although adequate therapy is essential to treat VAP infection, it seems that the severity of acute illness is more important than resistance.

Acknowledgements This work was supported by National Health Service grants FIS 08/0276 and FIS11/0164 from the Fondo de Investigación Sanitaria and was also supported by Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III and Ciber de Enfermedades Respiratorias (CB06/06/0037).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Niederman MS, Craven DE, Bonten MJ, Chastre J, Craig WA, Fagon JY et al (2005) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 171:388–416
- Eggimann P, Revelly JP (2006) Should antibiotic combinations be used to treat ventilator-associated pneumonia? *Semin Respir Crit Care Med* 27:68–81
- Garnacho-Montero J, Sa-Borges M, Sole-Violan J, Barcenilla F, Escobedo-Ortega A, Ochoa M et al (2007) Optimal management therapy for *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: an observational, multicenter study comparing monotherapy with combination antibiotic therapy. *Crit Care Med* 35:1888–1895
- Heyland DK, Cook DJ, Griffith L, Keenan SP, Brun-Buisson C; Canadian Critical Trials Group (1999) The attributable morbidity and mortality of ventilator-associated pneumonia in the critically ill patient. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1249–1256
- Gursel G, Demirtas S (2006) Value of APACHE II, SOFA and CPIS scores in predicting prognosis in patients with ventilator-associated pneumonia. *Respiration* 73:503–508
- Kollef MH, Silver P, Murphy DM, Trovillion E (1995) The effect of late-onset ventilator-associated pneumonia in determining patient mortality. *Chest* 106:1655–1662
- Luna CM, Videla A, Matterna J, Vay C, Famiglietti A, Vujacich P et al (1999) Blood cultures have limited value in predicting severity of illness and as a diagnostic tool in ventilator-associated pneumonia. *Chest* 116:1075–1084
- Luna CM, Aruj P, Niederman MS, Garzón J, Violi D, Prignoni A et al (2006) Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 27:158–164
- Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ, Barrero-Almodóvar AE, García-Garmendia JL, Bernabeu-Wittell M et al (2003) Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. *Clin Infect Dis* 36:1111–1118
- Reina R, Estenssoro E, Sáenz G, Canales HS, Gonzalvo R, Vidal G et al (2005) Safety and efficacy of colistin in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* infections: a prospective cohort study. *Intensive Care Med* 31:1058–1065
- Rios FG, Luna CM, Maskin B, Saenz Valiente A, Lloria M, Gando S et al (2007) Ventilator-associated pneumonia due to colistin susceptible-only microorganisms. *Eur Respir J* 30:307–313
- Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V et al; Spanish Network for research in Infectious Diseases (REIPI) (2012) Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1256–1272
- Lodise TP, Miller CD, Graves J, Furuno JP, McGregor JC, Lomaestro B et al (2007) Clinical prediction tool to identify patients with *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infections at greatest risk for multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 51:417–422
- Parker CM, Kutsogiannis J, Muscedere J, Cook D, Dodek P, Day AG et al; Canadian Critical Care Trials Group (2008) Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence, incidence, risk factors, and outcomes. *J Crit Care* 23:18–26
- Florescu DF, Qiu F, McCartan MA, Mindru C, Fey PD, Kalil AC (2012) What is the efficacy and safety of colistin for the treatment of ventilator-associated pneumonia? A systematic review and meta-regression. *Clin Infect Dis* 54:670–680
- Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C et al (2011) A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. *BMC Infect Dis* 11:272
- Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens JP, Lew PD, Suter PM (1991) Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic “blind” bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 143:1121–1129

18. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR (1987) A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 40:373–383
19. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20:864–874
20. Le Gall JR, Loirat P, Alperovitch A, Glaser P, Granthil C, Mathieu D et al (1984) A simplified acute physiology score for ICU patients. *Crit Care Med* 12:975–977
21. Niederman MS (2010) Hospital-acquired pneumonia, health care-associated pneumonia, ventilator-associated pneumonia, and ventilator-associated tracheobronchitis: definitions and challenges in trial design. *Clin Infect Dis* 51(Suppl 1):S12–S17
22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (2008) [updated 27 April, 2010; last accessed 29 October, 2010]. Available online at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.1
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. CLSI, Wayne, PA
24. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268–281
25. Combes A, Luyt CE, Fagon JY, Wolff M, Trouillet JL, Chastre J (2007) Early predictors for infection recurrence and death in patients with ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 35:146–154
26. Combes A, Luyt CE, Fagon JY, Wolff M, Trouillet JL, Gibert C et al; PNEUMA Trial Group (2004) Impact of methicillin resistance on outcome of *Staphylococcus aureus* ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 170:786–792
27. Combes A, Luyt CE, Fagon JY, Wolff M, Trouillet JL, Chastre J (2006) Impact of piperacillin resistance on the outcome of *Pseudomonas* ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 32:1970–1978
28. Gursel G, Aydogdu M, Ozyilmaz E, Ozis TN (2008) Risk factors for treatment failure in patients with ventilator-associated pneumonia receiving appropriate antibiotic therapy. *J Crit Care* 23:34–40
29. Deptuła A, Gospodarek E (2010) Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Arch Microbiol* 192:79–84
30. Dupont H, Montravers P, Gauzit R, Veber B, Pouriat JL, Martin C; Club d'Infectiologie en Anesthésie-Réanimation (2003) Outcome of postoperative pneumonia in the Eole study. *Intensive Care Med* 29:179–188
31. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Márquez-Vácaro JA et al (2005) *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. *Intensive Care Med* 31:649–655

Influence of Virulence Genotype and Resistance Profile in the Mortality of *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections

Carmen Peña,¹ Gabriel Cabot,² Silvia Gómez-Zorrilla,¹ Laura Zamorano,² Alain Ocampo-Sosa,³ Javier Murillas,² Benito Almirante,⁴ Virginia Pomar,⁵ Manuela Aguilar,⁶ Ana Granados,⁷ Esther Calbo,⁸ Jesús Rodríguez-Baño,⁹ Fernando Rodríguez-López,¹⁰ Fe Tubau,¹ Luis Martínez-Martínez,^{3,11} and Antonio Oliver²; for the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI)

¹Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona, ²Unidad de Investigación, Servicio de Microbiología y Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de Palma, Palma de Mallorca, ³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, ⁴Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Vall d'Hebrón, ⁵Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, ⁶Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, ⁷Sección de Enfermedades Infecciosas, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, ⁸Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Mutua de Terrasa, ⁹Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, ¹⁰Servicio de Microbiología Infecciosas, Hospital Universitario Reina Sofía-IMIBIC, Córdoba, and ¹¹Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

Background. The type III secretion system (TTSS) is a major virulence determinant of *Pseudomonas aeruginosa*. The objective of this study was to determine whether the TTSS genotype is a useful prognostic marker of *P. aeruginosa* bacteremia mortality. We also studied the potential association between TTSS genotypes and multidrug-resistant (MDR) profiles, and how this interaction impacts the outcome of bloodstream infections.

Methods. We performed a post hoc analysis of a published prospective multicenter cohort of *P. aeruginosa* bloodstream infections. The impact in mortality of TTSS genotypes (*exoS*, *exoT*, *exoU*, and *exoY* genes) and resistance profiles was investigated. Cox regression analysis was used to control for confounding variables.

Results. Among 590 patients, the 30-day mortality rate was 30% (175 patients), and 53% of them died in the first 5 days (early mortality). The unadjusted probabilities of survival until 5 days was 31.4% (95% confidence interval [CI], 17.4%–49.4%) for the patients with *exoU*-positive isolates and 53.2% (95% CI, 44.6%–61.5%) for *exoU*-negative isolates (log rank $P = .005$). After adjustment for confounders, *exoU* genotype (adjusted hazard ratio [aHR], 1.90 [95% CI, 1.15–3.14]; $P = .01$) showed association with early mortality. In contrast, late (30-day) mortality was not influenced by TTSS genotype but was independently associated with MDR profiles (aHR, 1.40 [95% CI, 1.01–1.94]; $P = .04$). Moreover, the *exoU* genotype (21% of all isolates) was significantly less frequent (13%) among MDR strains (particularly among extensively drug-resistant isolates, 5%), but was positively linked to moderately resistant (1–2 antipseudomonals) phenotypes (34%).

Conclusions. Our results indicate that the *exoU* genotype, which is associated with specific susceptibility profiles, is a relevant independent marker of early mortality in *P. aeruginosa* bacteremia.

Keywords. type III secretion system; multidrug resistance; virulence; bloodstream infections; *Pseudomonas aeruginosa*.

Received 10 July 2014; accepted 24 October 2014; electronically published 6 November 2014.

Correspondence: Antonio Oliver, PhD, Servicio de Microbiología, Hospital Son Espases, Ctra Valldemossa 79, 07010 Palma de Mallorca, Spain (antonio.oliver@ssib.es).

Clinical Infectious Diseases® 2015;60(4):539–48

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/ciu866

Pseudomonas aeruginosa (PA) is a common cause of nosocomial infections, which are often severe. Despite improvements in hospital care, PA bacteremia remains fatal in about 30% of cases [1, 2]. Poor outcomes in PA infections have been associated with factors related to the host, the antibiotic treatment, and the microorganism.

Septic shock, initial site of infection, and immunosuppression at the time of PA bacteremia are among the host factors implicated in increased mortality [3, 4]. In addition, the presence of multidrug-resistant (MDR) strains reduces the treatment options and enhances the risk of inadequate empirical therapy, although the excess of mortality explained by antimicrobial resistance is not evident during the first days after onset of bacteremia [1]. These findings might be related to the alteration of fitness caused by resistance genes or mutations, potentially reducing the virulence of the infecting microorganism [5].

Moreover, a large number of deaths occurred within the first 24–72 hours after the diagnosis of PA infection despite the use of adequate antimicrobial therapy [6, 7], and although the reasons for the PA bacteremia mortality are multifactorial, the intrinsic virulence of PA likely plays a major role. One of the most relevant virulence determinants of PA is the type III secretion system (TTSS) [8]. This secretion system injects potent cytotoxins, including ExoS, ExoT, ExoU, or ExoY, into eukaryotic cells [9]. The production of each of the different enzymes determines a distinct host tissue injury, with ExoU being the one determining a greater impact in bacterial virulence [8]. Moreover, the distribution of the genes encoding these cytotoxins is not uniform among *P. aeruginosa* strains, and some of them, particularly *exoS* and *exoU*, appear to be mutually exclusive. Therefore, defined clonal lineages, including the widespread MDR high-risk clones [10], are expected to be linked to specific TTSS genotypes, and this linkage may play a major role in their intrinsic virulence levels [11]. Moreover, recent studies suggest the existence of an association between defined TTSS genotypes and certain antibiotic resistance profiles [12–14].

Although several studies have investigated the presence of TTSS genes in PA strains involved in human diseases [13, 15], to our knowledge, only a limited number of studies with small sample sizes have evaluated the impact of these virulence mechanisms in the outcome of PA respiratory or bloodstream infections [6, 14, 16–18].

Therefore, we designed an analysis of a large multicenter, prospective cohort of PA bacteremia [1], with the main objective of investigating the impact of the TTSS genotype on PA bacteremia mortality. In addition, we studied the potential association between TTSS genotypes and MDR profiles, and how this interaction may impact the outcome of PA bloodstream infections.

MATERIALS AND METHODS

Setting and Design

We performed a post hoc analysis of a cohort of patients with PA bacteremia from a large multicenter study in Spain [1]. Clinical, microbiological, and outcome data were used as previously reported [1]. Only the first bacteremia episode for each patient

was included in the analysis. The study was approved by the local ethics committees of the participating centers.

Variables and Definitions

The following data were recorded: age and sex; comorbidities and severity of underlying diseases calculated using the Charlson comorbidity index [19] and severity of illness estimated by the Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) in intensive care unit patients [20]; the presence of neutropenia (absolute granulocyte count of <500/mL) and the use of immunosuppressive therapy (chemotherapy, radiotherapy and/or immunosuppressive drugs during the bacteremia presentation); source of bacteremia; severity of acute illness at presentation according to the Pitt bacteremia score [21]; presence of septic shock and multiorgan dysfunction syndrome at presentation and at 48 hours [22]; and antimicrobial treatment received. The source of bacteremia was divided into 2 categories: low risk (urinary tract, vascular catheter, and pancreaticobiliary) and high risk (all other sources) [23]. Antimicrobial therapy was considered adequate when the PA isolate was susceptible to the antimicrobial prescribed and the dose was in accordance with current medical standards. For outcomes, late mortality was defined as death from any cause occurring in the 30 days after the onset of PA bacteremia; mortality was considered as early mortality for patients who died within the first 5 days.

Microbiological Studies

Assessment of the Antimicrobial Susceptibility Profile

Detailed information describing the microbiological studies has been reported previously [2]. The following antimicrobial agents were tested: aztreonam, ceftazidime, cefepime, piperacillin, piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, levofloxacin, ciprofloxacin, and colistin. Clinical categories were determined according to the breakpoints defined by the Clinical and Laboratory Standards Institute [24].

Phenotype stratification of PA isolates was made in accordance with recent standard definitions [25]. MDR PA was defined as a strain nonsusceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antipseudomonal antimicrobial categories. Extensively drug-resistant (XDR) PA was defined as nonsusceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 antipseudomonal antimicrobial categories; thus, a XDR isolate was also included in MDR category [25]. To study the specific epidemiology of XDR isolates, MDR isolates were divided into XDR and MDR non-XDR. Finally, PA isolates nonsusceptible to ≥ 1 agent in 1 or 2 antimicrobial categories were considered moderately resistant. Thus, 4 phenotypes of PA isolates were considered: susceptible, moderately resistant, MDR non-XDR, and XDR.

TTSS Polymerase Chain Reaction Genotyping

Polymerase chain reaction (PCR) assays for detection of *exoS*, *exoT*, *exoU*, and *exoY* genes were performed with primers and

Table 1. Baseline Characteristics of Patients With *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia According to Type III Secretion System Genotype

Characteristic	<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>P</i> Value ^a	<i>exoU</i> ⁻ / <i>exoS</i> ⁻	<i>P</i> Value ^b
	(n = 126)	(n = 443)		(n = 21)	
Age, y, mean ± SD	65.0 ± 16.90	65.3 ± 16.35	.88	59.6 ± 21.84	.19
Male sex	86 (68)	301 (68)	.95	15 (71)	.77
Acquisition					
Nosocomial	74 (59)	254 (57)	.39	16 (76)	.06
Healthcare related	48 (38)	167 (37)	.46	3 (14)	.01
Community	4 (3)	22 (5)	.07	2 (10)	.12
PA phenotype					
Non-MDR	104 (82.5)	297 (67%)	.001	21 (100%)	.03
Susceptible	56 (44)	209 (47)	.58	15 (71)	.02
Moderately resistant	48 (38)	88 (20)	<.001	6 (29)	.40
MDR	22 (17.5)	146 (33)	.001	0	. . .
Non-XDR	18 (14)	69 (16)	.72	0	. . .
XDR	4 (3)	77 (17)	<.001	0	. . .
ICU stay	30 (24)	121 (27)	.43	6 (29)	.64
SAPS score, mean ± SD	47.3 ± 19.4	42.3 ± 17.5	.17	44.5 ± 15.0	.74
Charlson index, median (IQR)	3 (1–4)	2 (2–5)	.80	2 (1–3)	.09
Underlying condition					
Diabetes	41 (32.5)	110 (25)	.08	5 (24)	.42
Chronic lung disease	16 (13)	68 (15)	.46	2 (9.5)	1.00
Heart disease	26 (21)	77 (17)	.40	4 (19)	1.00
Solid malignancy	37 (29)	126 (28)	.84	6 (29)	.94
Hematologic malignancy	14 (11)	74 (17)	.12	2 (9.5)	1.00
Chronic renal failure	25 (20)	66 (15)	.18	3 (14)	.76
Chronic neurologic disease	10 (8)	31 (7)	.72	0	. . .
Cirrhosis	6 (5)	21 (5)	.99	2 (9.5)	.32
Immunosuppression	30 (24)	118 (27)	.52	4 (19)	.78
Neutropenia	5 (4)	25 (6)	.46	2 (9.5)	.26
Origin of bacteremia					
High-risk bacteremia	57 (45)	217 (49)	.46	9 (43)	.84
Unknown	31 (25)	123 (28)	.49	7 (33)	.43
Respiratory tract	9 (7)	54 (12)	.11	2 (9.5)	.66
Abdominal	10 (8)	15 (3)	.02	0	. . .
Soft tissue	4 (3)	16 (4)	.82	0	. . .
Other(s)	3 (2)	9 (2)	.81	0	. . .
Low-risk bacteremia	69 (55)	226 (51)	.46	12 (57)	.84
Vascular catheter	26 (21)	82 (18.5)	.58	6 (29)	.45
Urinary tract	39 (31)	116 (26)	.27	5 (24)	.47
Pancreaticobiliary	4 (3)	28 (6)	.27	1 (5)	.55
Clinical presentation					
Pitt score, median (IQR)	1 (0–3)	1 (0–3)	.47	1 (0–3)	.78
Shock initial	26 (21)	83 (19)	.63	5 (24)	.74
MODS initial	14 (11)	45 (10)	.75	3 (14)	.71
Shock/MODS at 48 h	4 (3)	27 (6)	.27	0	. . .
Outcome					
Late mortality (30-day)	34 (27)	133 (30.5)	.47	8 (38)	.31
Early mortality (5-day)	25 (73.5)	62 (47)	.005	6 (75)	.93

Data are presented as No. (%) unless otherwise specified.

Abbreviations: ICU, intensive care unit; IQR, interquartile range; MDR, multidrug resistant; MODS, multiorgan dysfunction syndrome; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; SAPS, Simplified Acute Physiology Score; SD, standard deviation; XDR, extensively drug resistant.

^a*exoU* vs *exoS*.

^b*exoU* vs *exoU*⁻/*exoS*⁻.

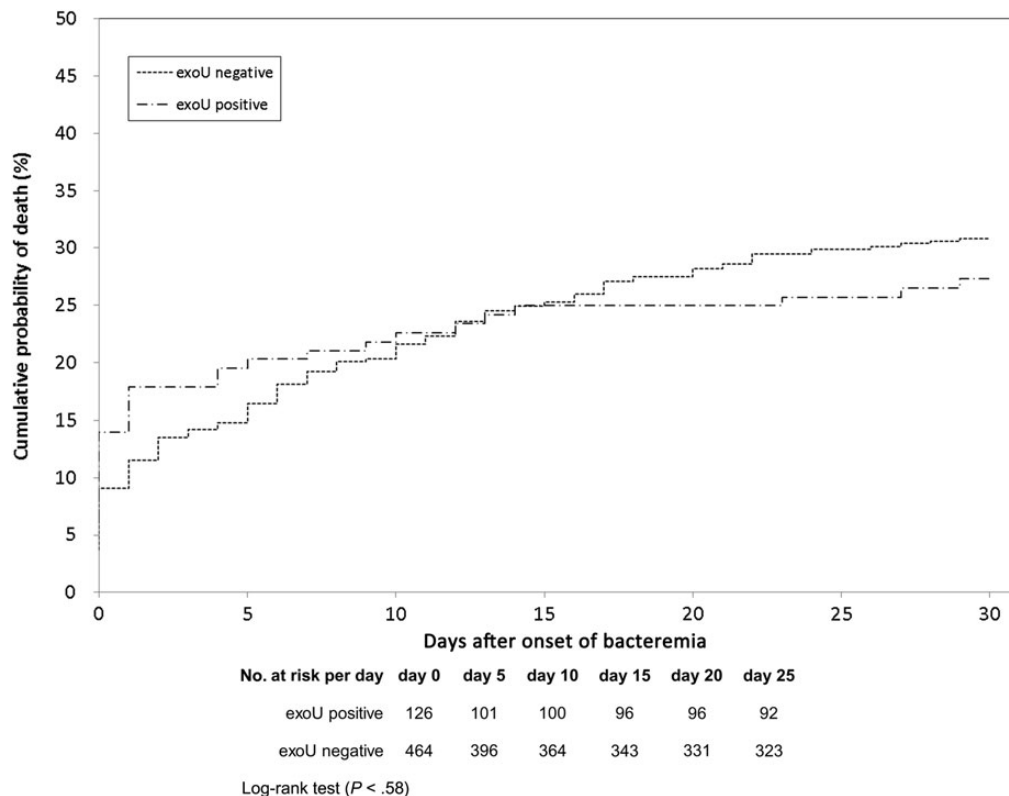


Figure 1. Probability estimate for 30-day mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia according to type III secretion system *exoU* genotype.

protocol described by Feltman et al [15] with slight modifications. PCR reactions were performed with AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems) in a DNA thermal cycler (Arctic Thermal Cycler, Thermo Fisher), under the following conditions: denaturation for 5 minutes at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension step of 10 minutes at 72°C.

Molecular Typing

Partial data on clonal relatedness were available from previous studies [2, 26, 27]. For the present work, all XDR isolates were analyzed through multilocus sequence typing (MLST) to identify prevalent high-risk clones [28, 29].

Statistical Analysis

Continuous variables were analyzed using a 2-tailed Student *t* test for normally distributed variables and the Mann–Whitney test for nonnormally distributed variables. Means and standard deviations are presented for normal data and medians with interquartile ranges for nonnormally distributed data. Survival curves were constructed by means of the Kaplan–Meier method and log-rank test to estimate the risk of death according to TTSS genotype and according to susceptibility profile. The outcome evaluated was death, and the date of the initial PA isolate was

considered as time 0. Patients were monitored until day 30 after bacteremia to determine early (5-day) and late (30-day) mortality; cases were censored from analysis either because of death or transfer to another hospital (those lost to follow-up were censored on the last follow-up day on which they were known to be alive).

To control for confounding effects of TTSS genotype (exposure) on time to mortality (early mortality and late mortality), we used multivariate adjusted hazard ratios (aHRs) with Cox regression. To assess effect modification, possible interaction terms between the exposure variable (TTSS genotype) and covariates were examined and maintained in the model depending on the results of the significance test ($P < .05$). In the crude analysis, variables that were associated with exposure with a P value $< .20$ were candidates for multivariate analysis. Statistical tests were 2-tailed; $P \leq .05$ was considered significant. All statistical analyses were performed with the SPSS package version 15.0.

RESULTS

Epidemiological and Clinical Characteristics According to TTSS Genotype

The TTSS genotype was characterized for 593 patients with a single episode of PA bacteremia. All strains were positive for

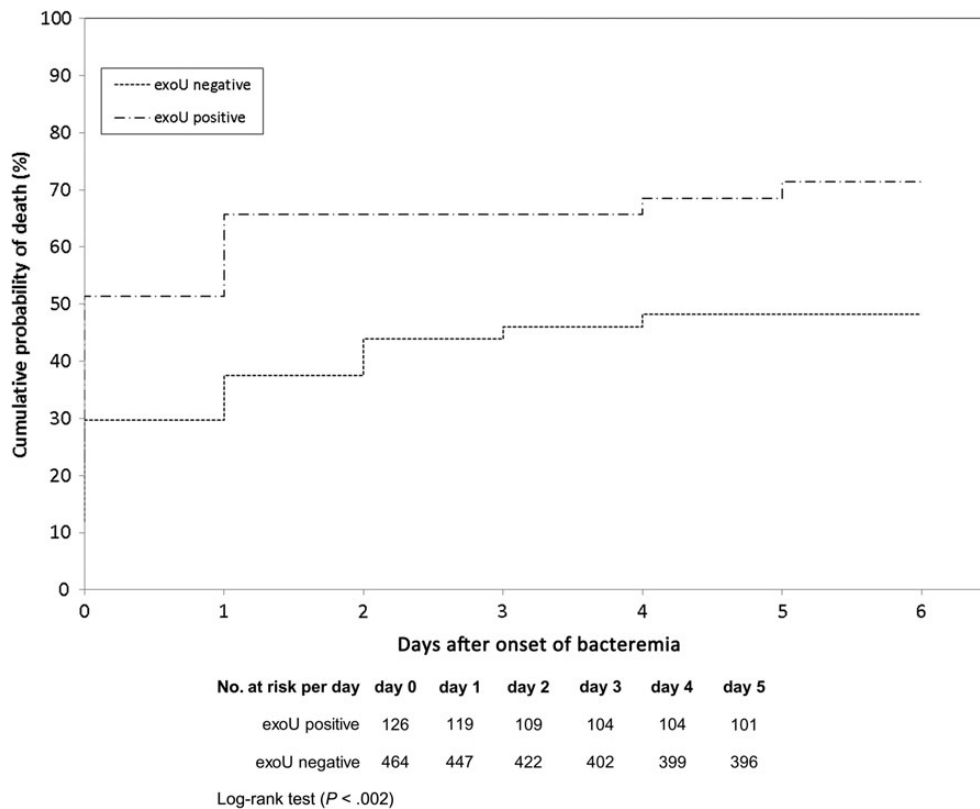


Figure 2. Probability estimate for 5-day mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia according to type III secretion system *exoU* genotype.

either *exoU* (126 strains [21%]) or *exoS* (443 strains [75%]), except for 3 (0.5%) and 21 (3.5%) strains that were positive or negative for both genes, respectively. Concomitantly, the presence of *exoT* and *exoY* was documented in nearly all PA strains (591 [98%] and 566 [95%], respectively).

The clinical and epidemiological characteristics according to TTSS genotype are shown in Table 1. Because *exoT* and *exoY* genotypes were nearly universally positive, these genes were not included in the analysis. Moreover, the 3 bacteremia episodes that exhibited both the *exoU* and *exoS* genotypes were excluded from the analysis given the very limited number of cases. Therefore, 3 major groups (590 patients) were analyzed and included in Table 1: *exoU*⁺/*exoS*⁻ (n = 126), *exoU*⁻/*exoS*⁺ (n = 443), and *exoU*⁻/*exoS*⁻ (n = 21). There were no significant differences in demographic data, underlying comorbidities, or presentation of severity of acute illness with the exception of the abdominal source of PA bacteremia that was more frequent in *exoU*⁺/*exoS*⁻ episodes than among *exoU*⁻/*exoS*⁺ cases (8% vs 3%; $P = .02$).

Crude Impact of TTSS Genotype in Mortality

As shown in Table 1, the TTSS genotype determined no significant differences in late (30-day) mortality. On the other hand, early mortality among patients with *exoU*⁺/*exoS*⁻ isolates was

73.5% compared with 47% among patients infected by *exoU*⁻/*exoS*⁺ strains ($P = .005$).

The overall 30-day mortality rate was 30% (175 patients), and 53% (93 patients) of them died in the first 5 days of bacteremia onset. The survival curve showed no significant differences in the 30-day cumulative probability of death (Figure 1) between the PA bacteremia isolates that were positive or negative for *exoU*, with the unadjusted probabilities of survival until day 30 being 69.5% (95% confidence interval [CI], 60.6%–77.2%) for *exoU*⁺ patients, and 69.1% (95% CI, 64.6%–73.3%) in the *exoU*⁻ group (log-rank $P = .58$). Nevertheless, the cumulative survival until day 5 (Figure 2) was significantly different between the PA episodes that were positive or negative for *exoU*. The unadjusted probabilities of survival until day 5 were 31.4% (95% CI, 17.4%–49.4%) for the patients with *exoU*⁺ PA isolates and 53.2% (95% CI, 44.6%–61.5%) in the PA bacteremia by *exoU*⁻ strains (log-rank $P = .002$).

Interplay Between TTSS Genotype and Drug Resistance Profiles

MDR phenotype was documented in 168 (28%) of the PA blood isolates, of which 87 were MDR non-XDR (52% of MDR and 15% of all isolates), and 81 were XDR (48% of MDR and 14% of all isolates). Susceptible phenotype was documented in 280 (47%), and the remaining 142 (24%) were stratified as

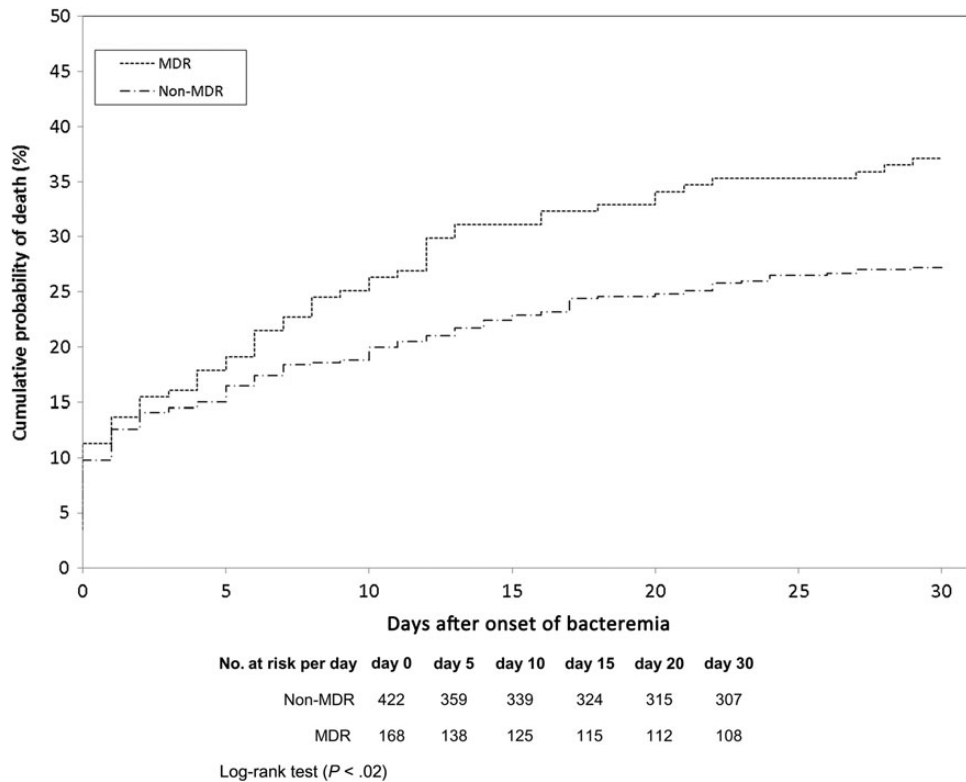


Figure 3. Probability estimate for 30-day mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia according to resistance phenotype. Abbreviation: MDR, multidrug resistant.

moderately resistant strains. Among the 4 different phenotypes, the *exoS* genotype was detected in 209 (75%) of susceptible isolates, in 88 (62%) of moderately resistant isolates, in 69 (79%) of MDR non-XDR strains, and in 77 (95%) of XDR PA strains. In contrast, the *exoU* genotype was detected in 56 (20%) of susceptible strains, in 48 (34%) of moderately resistant strains, in 18 (21%) of MDR non-XDR strains, and in 4 (5%) of XDR isolates. The 3 *exoU*⁺/*exoS*⁺ isolates showed the susceptible phenotype.

As shown in Table 1, *exoS*⁺ isolates were more frequently MDR than *exoU*⁺ isolates (33% vs 17.5%; $P = .001$), and obviously the other way around for the non-MDR phenotype (67% vs 82.5%). However, within the non-MDR phenotype, a significant association was observed between *exoU* genotype and moderately resistant PA strains (38% vs 20%; $P < .001$) but not for fully susceptible strains (44% vs 47%). Likewise, within the MDR phenotype, *exoU*⁺ isolates were significantly less frequent among XDR isolates (3% vs 17%; $P < .001$) but not among MDR non-XDR isolates (14% vs 16%).

In summary, the *exoU* genotype was positively linked to the moderately resistant phenotype and negatively linked to the XDR phenotype. According to our previous molecular typing data on selected isolates [26, 27], clonal diversity was extremely high (nearly each isolate representing a different clone) among

the moderately resistant phenotype isolates and, therefore, the excess of *exoU*⁺ strains is apparently not a consequence of the presence of specific clones. On the other hand, according to our previous data, clonal diversity was expected to be much more limited among XDR strains, since this phenotype is frequently linked to the so-called international high-risk clones. Thus, we analyzed by MLST all 81 XDR isolates and found, as expected, that the vast majority of the isolates belonged to previously identified high-risk clones, including sequence type (ST) 175 ($n = 62$), ST111 ($n = 9$), ST235 ($n = 2$), and ST244 ($n = 2$). Remarkably, of these high-risk clones, only ST235, represented by just 2 isolates, was positive for *exoU*, explaining the negative association between this TTSS gene and XDR phenotypes.

Crude Impact of MDR Phenotype in Mortality

Figure 3 shows the unadjusted probabilities of survival until day 30; survival was significantly (log-rank $P = .02$) higher for patients infected by non-MDR (72.9% [95% CI, 68.3%–77.1%]) than MDR strains (62.8% [95% CI, 55.0%–70.1%]). However, the probabilities of survival until day 5 (Figure 4) in non-MDR bacteremia (44.7% [95% CI, 35.5%–54.3%]) vs the MDR group (53.2% [95% CI, 40.2%–65.8%]) showed no significant differences (log-rank $P = .28$).

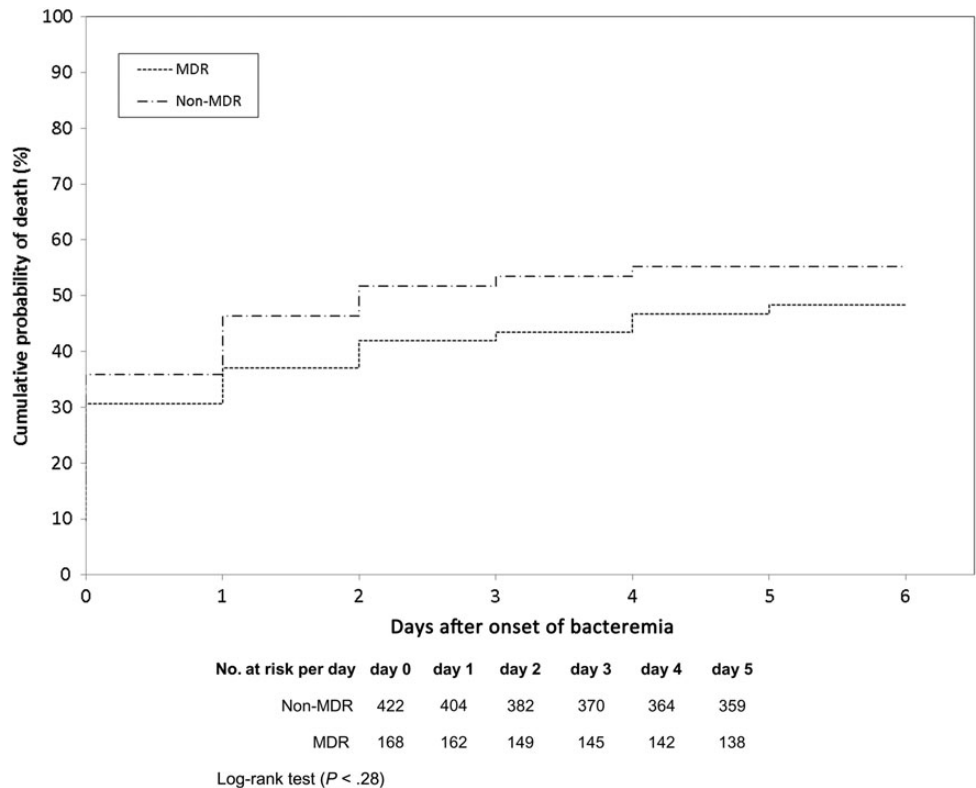


Figure 4. Probability estimate for 5-day mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia according to resistance phenotype. Abbreviation: MDR, multidrug resistant.

Outcome

Early Outcome: 5-Day Mortality

Ninety-three patients died: 45 (48%) patients with PA bacteremia caused by susceptible strains, 18 (19.5%) for PA moderately resistant strains, 17 (18.5%) caused by MDR non-XDR, and the remaining 13 (14%) for XDR strains. Unadjusted and adjusted 5-day mortality for patients with PA bacteremia is shown in Table 2. After adjustment for significant variables, the early mortality was associated (aHR, 1.90 [95% CI, 1.15–3.14]; $P = .01$) with *exoU*⁺ isolates (Table 2). Because a high clonal relatedness was observed among MDR/XDR isolates, we performed also the analysis of the impact of the *exoU* genotype on early mortality in the non-MDR group, which is mostly nonclonal as described above. Similar to the complete cohort, non-MDR *exoU*⁺ isolates were significantly associated with early mortality (aHR, 2.37 [95% CI, 1.32–4.27]; $P = .004$).

Late Outcome: 30-Day Mortality

A total of 175 patients died: 78 (45%) patients infected by PA-susceptible strains, 35 (20%) by moderately resistant strains, 32 (18%) by MDR non-XDR strains, and 30 (17%) by XDR isolates.

Crude analysis showed that *exoU* genotype had no impact on 30-day mortality. Multivariate analysis, adjusted by the

variables associated with worse prognosis, revealed MDR as one of the predictors of late mortality (Table 3).

DISCUSSION

The interconnections between antimicrobial resistance and virulence traits and how they may impact the outcome of bacterial infections is a subject of growing interest [30, 31]. In this work we analyzed the interplay between the TTSS, MDR phenotypes, and outcome of bloodstream infections.

As expected, *exoT* and *exoY* genes were detected in the vast majority of strains, but the presence of *exoS* and *exoU* was nearly mutually exclusive. Overall, 75% of the strains were *exoS*⁺ and 21% *exoU*⁺. Our findings are therefore in agreement with previous studies showing that *exoU*⁺, ranging from 10% to 40%, are less frequent than *exoS*⁺ (60%–90%) among PA clinical strains [12, 13, 15, 32, 33].

A number of previous studies with small sample sizes have evaluated the impact of TTSS in the outcome of PA respiratory or bloodstream infection [6, 14, 16–18]. Most of them evaluated whether the involved PA strains secreted (as evidenced by immunoblotting) or not TTSS cytotoxins in vitro and concluded that strains that produced at least 1 of them, designated

Table 2. Cox Regression Analysis of Predictor Factors for Early Mortality of Patients With *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection

Variables	Crude Analysis		Adjusted Analysis	
	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value
Age				
≤65 y				
>65 y	0.95 (.62–1.45)	.81	1.16 (.72–1.88)	.53
Sex				
Female				
Male	1.28 (.82–2.00)	.27	1.35 (.83–2.20)	.22
Non-MDR <i>P. aeruginosa</i> susceptibility				
No				
Yes	1.23 (.79–1.90)	.34		
TTSS <i>exoU</i>				
No				
Yes	1.81 (1.24–3.16)	.004	1.90 (1.15–3.14)	.01
Underlying disease				
Charlson index ≤2				
Charlson index ≥3	1.77 (1.13–2.78)	.011	2.01 (1.21–3.34)	.007
Source of bacteremia				
Low risk				
High risk	2.51 (1.44–4.39)	.012	1.94 (1.06–3.52)	.03
Immunosuppression				
No				
Yes	1.03 (.68–1.56)	.89		
Pitt bacteremia score				
<2				
≥2	3.63 (1.97–6.67)	<.001	2.86 (1.44–5.69)	.003
Initial shock				
No				
Yes	1.96 (1.30–2.96)	.001	0.83 (.49–1.39)	.48
Initial MODS				
No				
Yes	1.79 (1.15–2.75)	.010	0.93 (.55–1.59)	.80
Shock/MODS 48 h				
No				
Yes	2.59 (1.62–4.15)	<.001	2.47 (1.42–4.29)	.001
Adequate empiric antibiotic				
No				
Yes	0.89 (.57–1.39)	.62		

Abbreviations: CI, confidence interval; HR, hazard ratio; MDR, multidrug resistant; MODS, multiorgan dysfunction syndrome; TTSS, type III secretion system.

“secretors,” were associated with a worse outcome. Additionally, recent data show that the *exoU* genotype was associated with higher probability of developing pneumonia in patients with respiratory cultures positive for PA [14].

Table 3. Cox Regression Analysis of Predictor Factors for 30-Day Mortality of Patients With *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection

Variables	Crude Analysis		Adjusted Analysis	
	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value
Age				
≤65 y				
>65 y	1.52 (1.12–2.08)	.008	1.94 (1.39–2.70)	<.001
Sex				
Female				
Male	1.04 (.75–1.42)	.81	0.89 (.64–1.24)	.51
MDR <i>P. aeruginosa</i> susceptibility				
No				
Yes	1.42 (1.04–1.93)	.026	1.40 (1.01–1.94)	.04
TTSS <i>exoU</i>				
No				
Yes	0.90 (.62–1.30)	.58		
Underlying disease				
Charlson index ≤2				
Charlson index ≥3	1.71 (1.26–2.32)	<.001	1.90 (1.37–2.64)	<.001
Source of bacteremia				
Low risk				
High risk	2.99 (2.17–4.12)	<.001	2.22 (1.56–3.16)	<.001
Immunosuppression				
No				
Yes	1.90 (1.40–2.58)	<.001	1.24 (.89–1.72)	.20
Pitt bacteremia score				
<2				
≥2	4.14 (2.99–5.75)	<.001	2.10 (1.46–3.04)	<.001
Shock/MODS 48 h				
No				
Yes	7.3 (5.36–9.96)	<.001	5.29 (3.67–7.61)	<.001
Adequate definitive antibiotic				
No				
Yes	1.33 (.71–2.49)	.44		

Abbreviations: CI, confidence interval; HR, hazard ratio; MDR, multidrug resistant; MODS, multiorgan dysfunction syndrome; TTSS, type III secretion system.

Therefore, in this work we asked whether the TTSS genotype could be used as prognostic marker. For this purpose, we analyzed a large multicenter prospective cohort of PA bacteremia. Indeed, the multivariate analysis performed showed for the first time that the *exoU* genotype is independently associated with increased risk of early mortality of PA bloodstream infections. In contrast, late mortality was not influenced by TTSS genotype but was significantly higher among patients infected by MDR strains.

As expected, underlying disease severity, source of bacteremia, and severity of illness at the time of bacteremia are

associated with a poor prognosis, most notably during the first few days if the infection was due to PA strains with *exoU* genotype. Despite a strong association of *exoU* genotype and early mortality, no significant correlation was observed between the presence of this TTSS genotype and shock or development of organ failure. These findings may indicate that the *exoU* genotype is important but not essential in the development of severe clinical presentation, and that the complex interplay between subsequent inflammatory host response and/or underlying host condition may affect the severity of PA infection.

We also investigated the potential association between TTSS genotypes and resistance profiles. Interestingly, we found that the *exoU* genotype was significantly more frequent among non-MDR strains. However, a closer analysis revealed that the *exoU* genotype was positively linked to the moderately resistant phenotype and negatively linked to the XDR phenotype. Because clonal diversity was extremely high among the moderately resistant phenotype isolates, the excess of *exoU*⁺ strains is apparently not consequence of the presence of specific clones. Overall, the *exoU* genotype was detected in 21% of susceptible isolates but up to 34% of moderately resistant isolates. Regarding individual antibiotics among moderately resistant isolates, the prevalence of *exoU* genotype was highest among carbapenem-resistant isolates (48% for imipenem) followed by fluoroquinolone-resistant (32% for ciprofloxacin) and cephalosporin-resistant (31% for ceftazidime) isolates; in contrast, the *exoU* genotype was particularly infrequent among aminoglycoside-resistant isolates (6% for gentamicin). Thus, our results support and expand recent findings suggesting an association between the TTSS and fluoroquinolone resistance [12–14, 34], and determines a major step forward for understanding the interplay between resistance and virulence.

In contrast, the negative association between the *exoU* genotype and XDR phenotypes was determined by the widespread international high-risk clones ST175 and ST111 [26, 27, 35, 36], which were all *exoU*⁻/*exoS*⁺. It should be noted, however, that there is a third international high-risk clone, the *exoU*⁺/*exoS*⁻ ST235, which, although very infrequent in our series, has caused numerous outbreaks worldwide and is associated with a particularly poor outcome [11, 35, 37–39]. Thus, a high prevalence of this high-risk clone could have determined a significantly higher impact of MDR/XDR strains in mortality. Therefore, the specific clonal epidemiology of XDR strains in our series might be considered a limitation for the universal application of the study, but taken together, these results indicate that for analyzing the impact of XDR strains on the outcome of infections, the specific clonal types and, in particular, their TTSS genotype should be considered. Likewise, according to recent data [40], correlation between serotypes, clonal lineages, and TTSS genotypes should be analyzed in further studies.

Another potential limitation of our study is that we documented the presence of TTSS genes but did not evaluate

whether the corresponding cytotoxins are actually secreted in vitro. Indeed, it has been demonstrated that only a fraction of isolates, ranging from 44% to 77% according to different studies [16–18], secrete TTSS cytotoxins in vitro; further studies should therefore comparatively analyze the usefulness of TTSS genotype vs phenotype as prognostic marker of PA infections.

In conclusion, using a large multicenter prospective cohort of PA bacteremia, we demonstrate for the first time that the *exoU* genotype is independently associated with increased risk of early mortality of PA bloodstream infections, whereas late mortality is associated with MDR profiles. Our results also evidence a significant association between *exoU* genotype and individual resistance to several antipseudomonal agents, including carbapenems, fluoroquinolones, and cephalosporins. Finally, our results also highlight that XDR profiles are linked to a very limited number of specific clones (high-risk clones) presenting defined TTSS genotypes, which must be considered in the analysis of the infection outcomes.

Notes

Acknowledgments. We thank the other participants from the Spanish Network for Research in Infectious Diseases group: Mercedes Gurgui (Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona), Roger Sorde and Nieves Larrosa (Hospital Universitario Vall d'Hebrón) Cecilia Martín (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla), Dionisia Fontanals (Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Barcelona), Marina de Cueto and Maria Dolores Navarro (Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla), Julian Torre-Cisneros, Manuel Casal, Rosario Lara, Clara Natera and Antonio Rivero (Hospital Universitario Reina Sofia-IMIBIC, Córdoba).

Financial support. This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain, Instituto de Salud Carlos III, co-financed by European Regional Development Fund “A way to achieve Europe” through the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (RD06/0008 and RD12/0015) and grants 08/0276, PS09/00033, 11/00164, and PI12/00103. The study is also supported by Direcció General d'Universitats, Recerca i Transferència del Coneixement del Govern de les Illes Balears.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Peña C, Suarez C, Gozalo M, et al. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:1256–72.
2. Peña C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, et al. Effect of adequate single-drug versus combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. A post hoc analysis of a prospective cohort. *Clin Infect Dis* **2013**; 57:208–16.
3. Chamot E, Boffi El Amari E, Rohner P, Van delden C. Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47:2756–64.
4. Kang CI, Kim SH, Kim HB, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis* **2003**; 37:745–51.
5. Andersson DI. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol* **2006**; 9:461–5.

6. Hattemer A, Hauser A, Diaz M, et al. Bacterial and clinical characteristics of health-care and community-acquired bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57:3969–75.
7. Peña C, Gómez-Zorrilla S, Oriol I, et al. Impact of multidrug resistance on *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia outcome: predictors of early and crude mortality. *Eur J Microbiol Infect Dis* **2013**; 32:413–20.
8. Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* **2009**; 12:61–6.
9. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* **2009**; 7:654–65.
10. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* **2011**; 35:736–55.
11. Maatallah M, Cheriaa J, Backhrouf A, et al. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* **2011**; 6:e25617.
12. Agnello M, Wong-Beringer A. Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **2012**; 7:e42973.
13. Garey KW, Vo QP, Larocco MT, Gentry LO, Tam VH. Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Chemother* **2008**; 20:714–20.
14. Sullivan E, Bensman J, Lou M, Agnello M, Shriner K, Wong-Beringer A. Risk of developing pneumonia is enhanced by the combined traits of fluoroquinolone resistance and type III secretion virulence in respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* **2014**; 42:48–56.
15. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2001**; 147(pt 10):2659–69.
16. El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcome of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med* **2012**; 40:1157–63.
17. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, et al. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* **2002**; 30:521–8.
18. Roy-Burman A, Saver RH, Racine S, et al. Type III secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* **2001**; 183:1767–74.
19. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* **1987**; 40:373–83.
20. Le Gall JR, Loirat P, Alperovitch A, et al. A simplified acute physiologic score for ICU patients. *Crit Care Med* **1984**; 12:975–7.
21. Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, et al. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med* **1991**; 115:585–90.
22. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* **1992**; 20:864–74.
23. Kang CI, Kim SH, Park WB, et al. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:760–6.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Vol. 28, No. 3, 18th informational supplement. In: CLSI document M100-S18. Wayne, PA: CLSI, **2008**.
25. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **2012**; 18:268–81.
26. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56:6349–57.
27. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57:5527–35.
28. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* **2004**; 42:5644–9.
29. Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstDbNet—distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* **2004**; 5:86.
30. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* **2013**; 26:185–230.
31. Veesenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med* **2009**; 37:1777–86.
32. Janjua HA, Segata N, Bernabò P, Tamburini S, Ellen A, Jousson O. Clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from acute infections show a wide virulence range partially correlated with population structure and virulence gene expression. *Microbiology* **2012**; 158(pt 8):2089–98.
33. Wareham DW, Curtis MA. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. *Int J Med Microbiol* **2007**; 297:227–34.
34. Wong-Beringer A, Wiener-Kronish J, Lynch S, Flanagan J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and -resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* **2008**; 14:330–6.
35. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* **2014**; 69:1804–14.
36. Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, Van der Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol* **2011**; 49:2578–83.
37. Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* **2013**; 13:867–76.
38. Kim MJ, Bae IK, Jeong SH, et al. Dissemination of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of sequence type 235 in Asian countries. *J Antimicrob Chemother* **2013**; 68:2820–4.
39. Viedma E, Juan C, Acosta J, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53:4930–3.
40. Lu Q, Eggimann P, Luyt CE, et al. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Crit Care Med* **2014**; 18:R17.



Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies

Silvia Gómez-Zorrilla^a, Carlos Juan^b, Gabriel Cabot^b, Mariana Camoez^c, Fe Tubau^c, Antonio Oliver^b, M. Angeles Dominguez^c, Javier Ariza^a, Carmen Peña^{a,*}

^a Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Feixa Llarga s/n 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^b Microbiology Service, Hospital Universitario son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdiSPa), Ctra. Valldemossa 79, 07010 Palma de Mallorca, Spain

^c Microbiology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL, University of Barcelona, Feixa Llarga s/n 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2015

Accepted 20 February 2016

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa

Antibiotic resistance

Biological cost

Epidemic clones

High-risk clones

Animal models

ABSTRACT

The biological cost of multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (PA) remains unclear. This study aimed to evaluate the relationship between pathogenicity and the resistance profile of different PA strains, including the most common epidemic high-risk clones. Nine PA strains were studied, including two reference strains, PAO1 and PA14 [both susceptible to all antipseudomonals (multiS)], and seven clinical strains comprising three clinical multiS strains, a non-clonal multidrug-resistant (MDR) strain and the high-risk MDR clones ST111, ST235 and ST175. In vitro studies were performed to investigate growth rate, type III secretion system (TTSS) genotype, cytotoxicity and invasiveness. Additionally, a peritonitis/sepsis model was used in C57BL/6 mice. The in vitro bacterial duplication time was shorter in clinical multiS strains than in MDR-PA (0.42 ± 0.08 h vs. 0.55 ± 0.14 h; $P = 0.023$). Among the clinical strains, *exoU*⁺ genotype was observed only in the epidemic clone ST235. In the animal model, the probability of mortality at 48 h was 70% for clinical multiS strains vs. 7.5% for clinical MDR-PA ($P < 0.001$, log-rank). The high-risk clone ST235 was the only MDR strain that was able to cause mortality. Bacterial concentrations in peritoneal fluid were higher in mice inoculated with multiS strains compared with MDR-PA [log CFU/mL, 8.95 (IQR 3.42–9.32) vs. 1.98 (IQR 1.08–2.80); $P < 0.001$]. These data indicate that MDR profiles are associated with a reduction in virulence of PA in a murine model. Further studies are needed to elucidate the clinical implications of these results.

© 2016 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

The biological implications of antibiotic resistance for the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) are not clearly established. It is believed that acquisition of resistance mechanisms may have a negative impact on bacterial fitness (a fitness cost), resulting in impaired bacterial physiology and, in turn, a loss of virulence [1–4]. It had been suggested that the biological costs of resistance might have contributed to the disappearance of some resistant epidemic clones, since resistant pathogens could be replaced by susceptible strains once the antibiotic pressure decreased [5]. However, multidrug-resistant (MDR) bacteria could develop other compensatory mutations that may allow them to recover their

virulence without affecting the level of resistance [1,6]. Thus, compensation of the fitness cost of resistance might explain why resistant pathogens can persist even if the antibiotic pressure is reduced [1,6]. Moreover, in recent years, highly successful epidemic clones of MDR-PA, denominated high-risk clones, have been widely observed and have been shown to be responsible for outbreaks worldwide [7–11].

Despite the increasing dissemination of MDR-PA strains, the clinical consequences of multidrug resistance remain unclear. Although increased virulence would explain the worse outcome of MDR-PA, host-dependent and treatment-dependent factors should also be taken into account [12,13]. With regard to the host, patients with MDR infections tend to be critically ill, to have more severe underlying diseases and to spend longer in hospital, factors that may justify the poor outcomes of MDR infections [12,14,15]. In addition, MDR strains are associated with a greater probability of receiving initially inappropriate antimicrobial therapy, and the

* Corresponding author. Tel.: +34 93 260 75 26; fax: +34 93 260 76 37.
E-mail address: cpena@bellvitgehospital.cat (C. Peña).

delay in effective treatment may in part explain the worse clinical outcome of these patients [9,12–15]. However, there is a clinical impression that MDR strains may be associated with a more indolent clinical presentation than is observed with susceptible isolates [14–17]. Considering the above, it is difficult to assess through clinical research the possible deleterious impact of resistance and thus animal models are required.

The aim of the present study was to evaluate the correlation between different PA resistance patterns and their pathogenicity, defined as the ability of the bacteria to produce disease. Since the epidemic behaviour of high-risk clones may hamper this investigation, strains belonging to the most common high-risk clones (ST111, ST175 and ST235) were included. A murine peritonitis model was conducted to evaluate whether there were differences in virulence according to the resistance profile of PA. Some microbiological determinants, including the type III secretion system (TTSS) genotype, which is one of the most relevant virulence determinants of PA [9], were also studied *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Nine PA strains with different phenotypes, genotypes and resistance mechanisms were studied, including two reference strains (PAO1 and PA14) and seven clinical strains recovered from single patients admitted to Hospital Universitari de Bellvitge, an 850-bed tertiary-care university hospital in Barcelona, Spain. All of the clinical specimens selected (two from blood samples, four from bronchial samples and one from peritoneal fluid) had been implicated as pathogens for an acute invasive PA infection.

Susceptibility testing to different antipseudomonal agents (meropenem, imipenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam, ticarcillin, ciprofloxacin, aztreonam, fosfomicin and colistin) was performed using the MicroScan automated microdilution system (Dade International, West Sacramento, CA) following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations [18]. Phenotype stratifications were classified in accordance with recent standard definitions [19]. MDR-PA was defined as a strain non-susceptible to at least one agent in three or more antipseudomonal antimicrobial categories. Extensively drug-resistant (XDR) PA was defined as a strain non-susceptible to at least one agent in all but two or fewer antipseudomonal antimicrobial categories. Strains susceptible to all antipseudomonal agents tested were considered multisusceptible (multiS). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [20] was performed for all clinical strains. DNA restriction patterns generated by PFGE were interpreted in accordance with the guidelines of Tenover et al. [21]. All strains were analysed by multilocus sequence typing (MLST) using previously described protocols [22] and available databases (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) [23].

2.2. *In vitro* studies

2.2.1. Determination of growth rates

Following overnight culture of the bacterial strains on 5% blood agar plates (Becton Dickinson, Madrid, Spain), isolates were inoculated in tryptic soy broth (TSB) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and were incubated with continuous shaking at 37 °C overnight. The bacterial suspensions were adjusted based on turbidity to 10⁵ CFU/mL. The cultures were then incubated in TSB with shaking at 37 °C for 24 h, with serial samples being obtained at different time points (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 24 h). Blood agar plates were incubated with the obtained suspensions at 37 °C for 24 h to determine bacterial counts (CFU/mL) and the log₁₀ by 10-fold diluted cultures.

Growth rate curves and duplication times were determined from triplicate experiments.

2.2.2. Invasion assay

The invasion assay was performed as described by Harrison et al. [24], with slight modifications, on A549 human lung cells. Monolayers were seeded in 24-well tissue culture plates (SPL Life Sciences, Pocheon-Si, South Korea) using RPMI-1640 medium supplemented with glutamine, 10% foetal calf serum and 10 mg/L gentamicin (Biowest, Nuaille, France) as culture medium. Semiconfluent cell monolayers were washed with warm phosphate-buffered saline (PBS). Next, 500 µL of fresh medium containing ca. 5 × 10⁶ bacteria was added per well (multiplicity of infection of ca. 50) and was incubated for 1 h and 3 h at 37 °C in 5% CO₂. To remove extracellular bacteria, 1 mL of medium containing 400 mg/L amikacin was added during the last hour of incubation. Finally, A549 cells were washed with PBS and were lysed in 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Following cell lysis, bacteria were re-suspended in saline solution and were quantified by plating serial dilutions. Assays were carried out in quadruplicate and the results from at least three independent experiments were expressed as the total number of internalised bacteria per well (mean ± standard deviation) [25].

2.2.3. Cytotoxicity assay

A549 cells and PA cultures were prepared as previously described for the invasion assay [24,25]. After 1 h or 3 h of incubation, cytotoxicity towards A549 cells was quantified by measuring the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released into the culture supernatant using the Cytotoxicity Detection Kit Plus LDH (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) in the same wells used for the invasion experiments. Assays were carried out in quadruplicate in three independent experiments for each strain. The percentage of cytotoxicity was calculated relative to the value for the maximum LDH release control following the manufacturer's instructions.

2.2.4. PCR genotyping of the type III secretion system (TTSS)

PCR assays for detection of *exoS*, *exoT*, *exoU* and *exoY* genes were performed with the primers and protocol described by Feltman et al. [26]. PCR was performed using AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Applied Biosystems; Thermo Fisher, Waltham, MA) in a DNA thermal cycler (Arctic[™] Thermal Cycler; Thermo Fisher) under the following conditions: denaturation for 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, and a final extension step of 10 min at 72 °C.

2.3. *In vivo* studies

2.3.1. Inoculum preparation

Colonies from fresh overnight cultures on 5% blood agar plates were re-suspended and were grown for 4 h at 37 °C in TSB. Bacteria were pelleted by centrifugation, were washed and were re-suspended in sterile saline and adjusted to a density equal to 10⁵ CFU/mL.

2.3.2. Mouse peritonitis model

This study complied with the European Directive (2010/63/EU) and Spanish legislation (RD53/2013) on animal experimentation and was approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona (Barcelona, Spain). Female immunocompetent C57BL/6 mice (18–21 g) were used. Mice were kept five to a cage and received food and water *ad libitum*. The animal room was maintained in a 12-h light:dark cycle at 22 ± 2 °C with 50 ± 10% relative humidity.

The model was based on a previously described protocol [27]. Inoculation was performed by intraperitoneal injection. Briefly,

0.5 mL of an inoculum of 10^5 CFU/mL in exponential growth phase diluted with 5% (w/v) porcine gastric mucin in sterile saline (Sigma–Aldrich) was used.

Mucin was used as an adjuvant as it enhances the baseline virulence of bacteria by inhibiting the local macrophage system, thus rendering the mice susceptible to infection. Each strain was inoculated in groups of 10 animals. Follow-up within 7 days of inoculation was performed to assess mortality. In addition, for each surviving mouse, a control mouse inoculated with the same PA strain was studied 48 h after inoculation. Bacterial counts in peritoneal fluid samples and bacteraemia were examined for each mouse when it died or at 48 h in survivors. Blood and peritoneal samples were obtained as described below.

2.3.3. Sample collection and processing

Mice were anaesthetised intraperitoneally with 100 mg/kg ketamine (Meril Laboratorios S.A., Barcelona, Spain) plus 10 mg/kg xylazine (Laboratorios Calier S.A., Barcelona, Spain) and a peritoneal wash was performed by injecting 2 mL of sterile saline intraperitoneally followed by a 1-min external massage of the abdomen. The abdomen was then opened and 1 mL of peritoneal fluid was recovered from the peritoneum using an aseptic technique. Afterwards, 0.5–0.8 mL of blood was withdrawn by cardiac puncture and the animals were then killed by cervical dislocation. Peritoneal fluid samples were used to perform quantitative cultures. Qualitative blood cultures were also performed by culturing a blood sample in TSB for 24 h at 37 °C; 0.1 mL of the cultured broth was then plated on blood agar plates and was incubated again for 24 h to assess bacterial growth.

2.4. Statistical analysis

The Shapiro–Wilk test was used to evaluate normality. Continuous variables were expressed as the mean \pm standard deviation or the median [interquartile range (IQR)] as required. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages. For *in vitro* studies, statistical differences were examined by the Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA) as appropriate. Regarding *in vivo* studies, comparative analyses were performed with the Mann–Whitney *U*-test or Kruskal–Wallis test for continuous variables, and the χ^2 or Fisher's exact test for categorical variables. A Kaplan–Meier analysis was performed to evaluate differences in mortality according to the pattern of antimicrobial resistance of PA. Time (hours) was considered from the moment of inoculation (time 0) to the time of death (main event) or to the end of the study in survivors (censored time). Data were analysed using IBM SPSS Statistics for Windows v.19.0 (IBM Corp., Armonk, NY). All analyses were two-tailed and a *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Bacterial strains

Five isolates were susceptible to all studied antimicrobials (multiS) and four were MDR. PFGE confirmed that the bacterial isolates were genetically discrete. Among the susceptible strains, PAO1 (strain 1) and PA14 (strain 2) were included as laboratory reference strains, and strains 3–5 were selected as clinical isolates. Four clinical MDR-PA strains were selected: a MDR, non-XDR non-clonal isolate (strain 6); a MDR, non-XDR clonal isolate previously described [28], belonging to the high-risk clone ST111 (strain 7); a clonal XDR metallo- β -lactamase-producing PA (high-risk clone ST235) (strain 8); and a clonal XDR isolate responsible for a sustained endemic outbreak in our hospital (high-risk clone ST175)

(strain 9) [29]. Data regarding molecular features, susceptibility profiles and resistance mechanisms of the strains are summarised in Table 1.

3.2. *In vitro* studies

An *in vitro* growth curve experiment was performed to assess whether there were differences in the growth rate of PA according to the resistance pattern. Data for bacterial duplication times are shown in Table 2. The duplication time was shorter in multiS strains (including reference strains) than in MDR/XDR strains (0.45 ± 0.10 h vs. 0.55 ± 0.14 h; $P=0.05$). Statistical differences were also observed in duplication time between clinical multiS strains and clinical MDR/XDR strains (0.42 ± 0.08 h vs. 0.55 ± 0.14 h; $P=0.023$). Among MDR/XDR strains, a trend towards a significant difference was observed when comparing MDR vs. XDR strains (0.62 ± 0.13 h vs. 0.48 ± 0.14 h; $P=0.06$).

Table 2 also shows the TTSS genotypes, cytotoxicity and invasiveness of the studied strains. *exoT* and *exoY* genes were detected in all of the strains, whilst *exoS* and *exoU* were mutually exclusive. All three clinical multiS isolates as well as three of the four MDR/XDR strains showed the *exoS*⁺/*exoU*⁻ TTSS genotype. Only the XDR epidemic strain 8 (ST235) showed the *exoS*⁻/*exoU*⁺ genotype, which is associated with increased virulence [9,30]. Overall, cytotoxicity of clinical strains was more similar to reference strain PAO1 than to the highly cytotoxic *exoU*⁺ reference strain PA14. These results are consistent with the fact that all but one of the strains were *exoU*⁻. Indeed, among the clinical strains, cytotoxicity was highest for the single *exoU*⁺ strain (strain 8), although the obtained values were still much lower than those obtained for PA14. No significant differences in cytotoxicity were documented between clinical multiS and clinical MDR/XDR strains. Regarding invasiveness, it is noteworthy that all of the strains were at least as invasive as the invasive reference strain PAO1. Moreover, five of the seven clinical strains were significantly more invasive than reference strain PAO1. It should also be noted that in contrast to PA14, the *exoU*⁺ clinical strain was also highly invasive. Once again, no significant differences in invasiveness were documented between clinical multiS and MDR/XDR strains.

3.3. *In vivo* studies in a murine peritonitis model

A total of 136 mice were used in the murine model. For survival studies, 90 mice were used in nine groups, with each group inoculated with a different PA strain. Of the 90 mice, 44 died and all deaths occurred in the first 48 h. In addition, 46 control mice (i.e. one for each surviving mouse) were used to study peritoneal counts and bacteraemia at 48 h of inoculation. All mice inoculated with laboratory reference strains died in the first 48 h after inoculation. Progression to death evolved rapidly in mice inoculated with clinical multiS strains compared with those inoculated with clinical MDR-PA isolates. The probability of mortality at 48 h was 70% for clinical multiS strains vs. 7.5% for clinical MDR-PA ($P<0.001$, log-rank). High-risk clone ST235 (strain 8) was the only MDR strain that produced mortality, with differences in mortality between this strain and the remaining MDR-PA ($P=0.02$, log-rank). The survival study results are shown in Fig. 1.

PAO1 and PA14 produced bacteraemia in all inoculated mice. No differences in the ability of produce bacteraemia were observed when comparing clinical multiS strains and MDR isolates (70% vs. 65%; $P=0.80$). However, all multiS-inoculated mice with bloodstream infection died, whereas MDR strains could produce bacteraemia without leading to death (100% mortality for bacteraemia in multiS strains vs. 11.5% in MDR strains; $P<0.001$).

PA strains causing lethal systemic disease presented elevated bacterial concentrations, whereas survivor mice were able to clear

Table 1
Molecular features, susceptibility profiles and resistance mechanisms of the *Pseudomonas aeruginosa* isolates studied.

Remarks	Strain 1	Strain 2	Strain 3	Strain 4	Strain 5	Strain 6	Strain 7	Strain 8	Strain 9
Clinical sample	Reference strain PAO1	Reference strain PA14	Clinical strain HUB282853/12	Clinical strain HUB302353/12	Clinical strain HUB205003/13	Clinical strain HUB246520/12	Clinical strain HUB259463/12	Clinical strain HUB293881/13	Clinical strain HUB273708/12
MLST ^a	NA	NA	Blood ST17	Respiratory ST381	Respiratory ST1707	Respiratory ST274	Respiratory ST111	Peritoneal fluid ST235	Blood ST175
PFGE	ND	ND	Non-epidemic multis	Non-epidemic multis	Non-epidemic multis	Non-epidemic MDR, non-XDR AmpC	Epidemic clone MDR, non-XDR MexXY-OprM	Epidemic clone XDR VIM-2 MBL;	Epidemic clone XDR OprD porin deletion;
Resistance profile	multis	multis	NA	NA	NA	hyperproduction; AME	overexpression; PSE-1 β -lactamase; AME;	AME;	hyperproduction; AME;
Resistance mechanisms ^b	NA	NA	NA	NA	NA	AME	QRDR mutations	QRDR mutations	QRDR mutations
Resistance phenotype									
Carbapenems									
MEM	S	S	S	S	S	S	S	R	R
IPM	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Aminoglycosides									
GEN	S	S	S	S	S	R	R	R	R
TOB	S	S	S	S	S	S	R	R	R
AMK	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Antipseudomonal cephalosporins									
FEP	S	S	S	S	S	I	I	R	R
CAZ	S	S	S	S	S	R	S	R	R
Antipseudomonal penicillins									
TZP	S	S	S	S	S	R	R	R	R
TIC	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Fluoroquinolones									
CIP	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Monobactams									
ATM	S	S	S	S	S	R	S	R	R
Phosphonic acid derivatives									
FOF	S	S	S	S	S	R	S	R	R
Polymyxins									
CST	S	S	S	S	S	S	S	S	S

NA, not applicable; MLST, multilocus sequence typing; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; ND, not done; multis, multidrug-susceptible; MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant; AME, aminoglycoside-modifying enzyme; QRDR, quinolone resistance-determining region; MBL, metallo- β -lactamase; MEM, meropenem; IPM, imipenem; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; AMK, amikacin; FEP, ceftazidime; TZP, piperacillin/tazobactam; TIC, ticarcillin; CIP, ciprofloxacin; ATM, aztreonam; FOF, fosfomicin; CST, colistin; S, susceptible; R, resistant; I, intermediate.

^a According to MLST database (<http://pubmlst.org>).

^b Resistance mechanisms were characterised in previous studies [29,30].

Table 2
In vitro and in vivo results.

Strain	Resistance profile		In vitro studies		In vivo studies				
	Duplication time (h) ^a		Cytotoxicity ^{ab}	Invasiveness ^{a,c}	Survival	Survivors (%)	Bacteraemia (%)	Bacterial count in peritoneal fluid	Log CFU/mL (death/surviving mice) ^d
	TTSS genotype	exoS							
Strain 1 (PAO1)	P	N	10.3 ± 2.62	100.0 ± 33.8	26 (20–30)	0 (0)	10 (100)	1.15 × 10 ⁹ (9.5 × 10 ⁸ –2.72 × 10 ⁹)	9.03 (8.99–9.35)/–
Strain 2 (PA14)	N	P	84.3 ± 0.13	8.9 ± 3.2	20 (19.5–24)	0 (0)	10 (100)	6.95 × 10 ⁸ (4.56 × 10 ⁸ –1.56 × 10 ⁹)	8.84 (8.66–9.12)/–
Strain 3 (ST17)	P	N	11.9 ± 0.15	2322.9 ± 135.4	24 (20–26)	0 (0)	10 (100)	8.78 × 10 ⁸ (3.02 × 10 ⁸ –1.61 × 10 ⁹)	8.95 (8.5–9)/–
Strain 4 (ST381)	P	N	14.0 ± 0.09	991.0 ± 81.2	32 (30–48)	1 (10)	10 (100)	2.08 × 10 ⁹ (1.2 × 10 ⁹ –2.6 × 10 ⁹)	9.36 (9.31–9.6)/3.8 (3.8–3.8)
Strain 5 (ST1707)	P	N	6.8 ± 0.03	272.2 ± 29.6	168 (131–168)	8 (80)	2 (20)	3.38 × 10 ⁷ (160–1.5 × 10 ⁷)	8.51 (7.78–9.25)/2.53 (2.07–3.04)
Strain 6 (ST274)	P	N	11.3 ± 1.48	105.4 ± 13.9	168 ^e	10 (100)	9 (90)	74 (0–343)	–1.87 (1–2.49)
Strain 7 (ST111)	P	N	11.0 ± 0.13	100.0 ± 35.4	168 ^e	10 (100)	6 (60)	106 (17.5–420)	–2.02 (1.23–2.57)
Strain 8 (ST235)	P	N	19.0 ± 0.20	2426.0 ± 677.1	168 (45–168)	7 (70)	7 (70)	1.47 × 10 ³ (182–3.5 × 10 ⁷)	7.6 (7.5–7.8)/2.74 (2.12–3.2)
Strain 9 (ST175)	P	N	11.7 ± 0.18	234.1 ± 78.0	168 ^e	10 (100)	4 (40)	25 (0–120)	–1.39 (0.9–1.96)

TTSS, type III secretion system; multiS, multidrug-susceptible; P, positive; N, negative; MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant.

^a Mean ± standard deviation.

^b The percentage of cytotoxicity was calculated relative to the value for the maximum lactate dehydrogenase (LDH) release control.

^c Invasiveness was calculated as the relative value (taking PAO1 as reference) of the total numbers of internalised bacteria per well.

^d Median (interquartile range).

^e All animals in these groups survived the period of study.

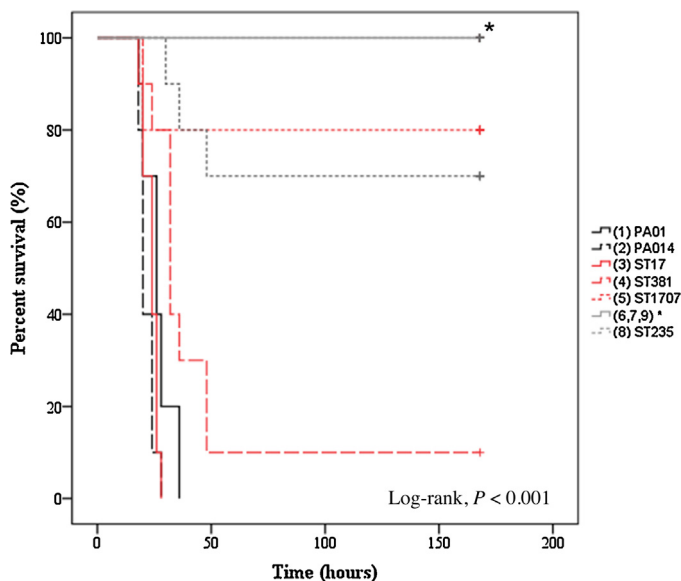


Fig. 1. Survival analysis comparing nine groups of mice ($n = 10$) infected with *Pseudomonas aeruginosa* (PA) isolates using a murine sepsis/peritonitis model. Survival curves show the probability of mortality based on the strain of PA inoculated. Black lines, reference strains; red lines, clinical susceptible strains; grey lines, clinical MDR/XDR strains. * This line represents strain 6 (ST274), strain 7 (ST111) and strain 9 (ST175) without any loss and therefore overlap. MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant.

infection in peritoneal fluid. Bacterial counts in peritoneal fluid were higher in mice inoculated with clinical multiS strains than in those inoculated with MDR strains [log CFU/mL, 8.95 (IQR 3.42–9.32) vs. 1.98 (IQR 1.08–2.82); $P < 0.001$]. Regarding dead mice, bacterial counts were higher in mice who had been inoculated with a clinical multiS strain [9.2 (IQR 8.9–9.4)] than those inoculated with a clinical MDR strain [7.6 (IQR 7.5–7.7)] ($P = 0.004$). In the surviving mice, statistical differences were also observed at 48 h [clinical multiS strains 2.43 (IQR 2.13–3.34) vs. MDR strains 1.88 (IQR 1–2.52); $P = 0.031$].

3.4. Correlation between in vitro and in vivo assays

When analysing the impact of TTSS genotype on mortality, a trend towards statistical significance was observed when comparing mortality between mice infected by *exoU*⁺ strains and those infected by *exoU*[–] strains [13/20 (65%) vs. 31/70 (44.3%); $P = 0.10$]. Regarding cytotoxicity, mice that died had been inoculated by more cytotoxic strains than those that survived [12.95 (IQR 10.30–19.00) vs. 11.30 (IQR 11–11.70); $P = 0.002$]. No statistical differences were found when studying the association between invasiveness and mortality.

The ability to develop bacteraemia was positively linked to cytotoxicity since the strains causing bacteraemia in mice presented higher cytotoxicity than those that did not cause bacteraemia [11.90 (IQR 11–19.00) vs. 11 (IQR 6.8–11.70); $P = 0.005$]. However, the ability to develop bacteraemia did not present a statistical association with either TTSS genotype or invasiveness.

To evaluate the correlation of bacterial counts in peritoneal fluid with in vitro assays, cytotoxicity and invasiveness variables were dichotomised based on the median. Mice inoculated with more cytotoxic strains showed a higher bacterial count than those inoculated with less cytotoxic strains [log number of CFU/mL, 8.86 (7.76–9.32) vs. 2.32 (1.48–4.93); $P < 0.001$]. In addition, mice inoculated with more invasive strains had a higher bacterial count in peritoneal fluid than those inoculated with less invasive strains [8.28 (2.83–9.24) vs. 2.53 (1.48–8.96); $P = 0.007$]. No significant

differences were observed when comparing mice inoculated with *exoU*⁺ compared with *exoU*⁻ strains [8.32 (3.12–8.87) vs. 3.34 (1.83–9.03); *P* = 0.38].

4. Discussion

In our hospital, a progressive increase in XDR-PA isolates has been observed since 2005 in an epidemiological setting of a sustained endemic outbreak [29]; however, the clinical impression is that these isolates have a more indolent presentation than susceptible strains. In previous studies, we found that early mortality linked to MDR-PA was less frequent than occurred with susceptible PA [14,15]. This experience led us to conduct an experimental study to investigate this issue further. In addition, recent reports provided evidence of the existence of few global MDR/XDR-PA clones that are disseminated in hospitals worldwide. Currently, these epidemic high-risk clones are responsible of the majority of MDR- and XDR-PA infections worldwide. For this reason, we included three strains belonging to the most common high-risk clones and compared them with other clinical PA isolates to investigate the virulence and fitness of these international clones.

A murine peritonitis sepsis model has previously been used in research with PA [31,32] and has been widely used to evaluate the relationship between resistance pattern and virulence with other bacteria [33,34]. We found that mice inoculated with susceptible strains not only presented a higher mortality but also produced a faster death than those inoculated with MDR/XDR strains, suggesting that susceptible strains may behave in a more aggressive way than MDR/XDR strains. These data are consistent with prior studies showing that mice inoculated with MDR strains survived longer than those inoculated with susceptible isolates, suggesting that antibiotic resistance is associated with a biological cost [4,16,17,35].

Besides the animal model, some microbiological determinants that may be linked to the pathogenicity of PA were investigated *in vitro*. The *in vitro* growth rate study showed that clinical susceptible strains had a shorter bacterial duplication time than clinical MDR/XDR strains (0.42 ± 0.08 vs. 0.55 ± 0.14 ; *P* = 0.023). Although the differences were small, they were significant and consistent with prior research demonstrating that resistance was associated with a reduction in *in vitro* growth rates [2–5]. It should also be noted that a recent study using *in vitro* competitive growth assays demonstrated that competition indexes were significantly lower in high-risk clones than in susceptible strains [8].

Regarding the TTSS genotype, it is known to be a major virulence determinant of PA. This secretion system injects potent cytotoxins, including ExoS, ExoT, ExoU and ExoY, into eukaryotic cells. *exoU*⁺ is one of the most important virulence determinants of PA and is associated with an increased risk of early mortality [9,30]. We investigated the impact of TTSS genotype on the mortality and found that mice inoculated with the *exoS*⁻/*exoU*⁺ genotype were more likely to die than those inoculated with *exoS*⁺/*exoU*⁻ strains. Although the differences were not significant, a trend towards significance was observed. In fact, among the three highly successful epidemic clones included in this study (ST111, ST175 and ST235), only ST235 was able to cause mortality and it was the only clone of those studied with the *exoS*⁻/*exoU*⁺ genotype. In line with these findings, a recent study demonstrated that among several high-risk clones studied, only VIM-2-positive ST235 isolates presented the *exoU* genotype [9].

In the current study, none of the microbiological determinants investigated can explain on its own the unequal mortality found between susceptible and resistant strains. The small differences in growth rate documented could have an effect but they are unlikely to be the sole cause of the reduced virulence documented for MDR

strains. Indeed, a recent study has shown that epidemic MDR/XDR high-risk clones such as ST111, ST175 and ST235 are characterised by a defined set of biological markers that include defects in the three types of bacterial motility (twitching, swimming and swarming) and in the production of the siderophore pyoverdine and the cytotoxin pyocyanin [8]. All of these factors could well have a major impact on the outcome of PA infections and therefore they need to be specifically addressed in future studies.

The present study also provides evidence that the pathogenicity of PA strains may differ among strains with a similar pattern of resistance, as shown by the behaviour of strain 8 (ST235). Similarly, previous *in vivo* experimental studies found that although most of the MDR strains presented a reduction in invasiveness and mortality, some of them remain as virulent as susceptible strains [4,36]. Research also suggests that certain mechanisms of resistance, such as deletion of the porin OprD, may lead to an increase in *in vivo* fitness in a mouse model [37]. These data demonstrate that the association between antibiotic resistance and the virulence of PA is complex and that it may depend not only on several microbiological determinants but also on different interactions with the immune system. Giamarellos-Bourboulis et al. suggest that a different inflammatory response may occur depending on the resistance profile of PA [17,35].

This study has a number of limitations. First, *in vivo* studies were performed in a single mouse strain and there may have been differences in the immune response had other mouse strains been used [38]. However, as all of the PA isolates were tested in C57BL/6 mice, the study retains homogeneity. Second, the sample size was small and differences were not clearly significant when evaluating the impact of TTSS genotype on mortality. Third, we did not use isogenic mutants, a strategy that would have allowed us to study the impact of each mechanism of resistance on PA virulence.

5. Conclusions

In summary, an experimental model of peritonitis/sepsis in C57BL/6 mice was conducted by inoculation of several strains of PA with different antibiotic resistance profiles, including three strains belonging to the most common epidemic high-risk clones that are widely disseminated in hospitals worldwide.

We observed that mice inoculated with susceptible strains showed a higher rate of mortality, died more quickly and had a higher bacterial concentration in peritoneal fluid. These findings suggest that acquisition of resistance by PA may be associated with a reduction in pathogenicity in a murine model. However, evaluating the impact of resistance on bacterial fitness is a complex issue, as several host–pathogen variables may be involved. Further studies to investigate the virulence determinants of PA and their interaction with the host response are required to clarify the clinical implications of the results.

Acknowledgments

The authors would like to thank Maria Eugenia Pachón (Institute of Biomedicine of Seville, Seville, Spain) for her guidance on performing the animal model, and Michael Maudsley (Language Advisory Service, University of Barcelona, Barcelona, Spain) for revising the English manuscript.

Funding

This work was supported by grants FIS 11/00164 and PI12/00103 from the Instituto de Salud Carlos III, co-funded by the European Regional Development Fund ‘A way to build Europe’, the Spanish

Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI) and the CIBER de Enfermedades Respiratorias [CB06/06/0037].

Competing interests

None declared.

Ethical approval

This study complied with the European Directive (2010/63/EU) and Spanish legislation (RD53/2013) on animal experimentation and was approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona (Barcelona, Spain) [ref. no. 456/13].

References

- Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 2010;8:260–71.
- Sun Z, Jiao X, Peng Q, Jiang F, Huang Y, Zhang J, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness. *Cell Physiol Biochem* 2013;31:347–53.
- Deptula A, Gospodarek E. Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Arch Microbiol* 2010;192:79–84.
- Abdelraouf K, Kabbara S, Ledesma KR, Poole K, Tam VH. Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1311–7.
- Nielsen KL, Pedersen TM, Udekwi KI, Petersen A, Skov RL, Hansen LH, et al. Fitness cost: a bacteriological explanation for the demise of the first international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1325–32.
- Schulz zur Wiesch P, Engelstädter J, Bonhoeffer S. Compensation of fitness cost and reversibility of antibiotic mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2085–95.
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:6349–57.
- Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5527–35.
- Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2015;60:539–48.
- Edelstein VM, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'souza JW, Tapalski DV, Azizov IS, et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 2013;13:867–76.
- Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:1804–14.
- Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcome: mortality, length of hospital stay and health care cost. *Clin Infect Dis* 2006;42(Suppl. 2):S82–9.
- Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2010;10:441–51.
- Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1265–72.
- Peña C, Gómez-Zorrilla S, Oriol I, Tubau F, Domínguez MA, Pujo M, et al. Impact of multidrug resistance on *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia outcome: predictors of early and crude mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:413–20.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Kousoulas V, Panagou C, Adamis T, Baziaka F, Skiadas I, et al. Experimental sepsis using *Pseudomonas aeruginosa*: the significance of multi-drug resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:357–61.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Tzepe I, Tsovolou I, Spyridaki A, Tsaganos T, Vaki I, et al. Impact of multidrug resistance on experimental empyema by *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiration* 2011;82:46–53.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. Document M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske GK, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
- Deplano A, Denis O, Poriel L, Hocquet D, Nonhoff C, et al. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2005;43:1998–2204.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004;42:5644–9.
- Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstDBNet—distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinform* 2004;5:86.
- Harrison EM, Carter ME, Luck S, Ou HY, He X, Deng Z, et al. Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infect Immun* 2010;78:1437–46.
- Shaver CM, Hauser AR. Interactions between effector proteins of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system do not significantly affect several measures of disease severity in mammals. *Microbiology* 2006;152:143–52.
- Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2001;147:2659–69.
- Frimodt-Møller N. The mouse peritonitis model: present and future use. *J Antimicrob Chemother* 1993;31(Suppl. D):55–60.
- Peña C, Suarez C, Tubau F, Juan C, Moya B, Domínguez MA, et al. Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1 β -lactamase. *J Clin Microbiol* 2009;47:2381–7.
- Suarez C, Peña C, Arch O, Domínguez MA, Tubau F, Juan C, et al. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. *BMC Infect Dis* 2011;13:272.
- Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:61–6.
- Scholl D, Martin Jr DW. Antibacterial efficacy of R-type pyocins towards *Pseudomonas aeruginosa* in a murine peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1647–52.
- Barekzi NA, Poelstra KA, Felts AG, Rojas IA, Slunt JB, Grainger DW. Efficacy of locally delivered polyclonal immunoglobulin against *Pseudomonas aeruginosa* peritonitis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1609–15.
- Azoulay-Dupuis E, Rieux V, Muffat-Joly M, Bédos JP, Vallée E, Rivier C, et al. Relationship between capsular type, penicillin susceptibility, and virulence of human *Streptococcus pneumoniae* isolates in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1575–7.
- López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, McConell MJ, Docobo-Pérez F, Smani Y, Fernández-Reyes M, et al. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis* 2011;203:545–8.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Plachouras D, Tzivra A, Kousoulas V, Bolanos N, Raftogiannis M, et al. Stimulation of innate immunity by susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro and in vivo study. *Clin Exp Immunol* 2004;135:240–6.
- Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, et al. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med* 2002;1:109–18.
- Skurnik D, Roux D, Cattoir V, Danilchanka O, Lu X, Yoder-Himes DR, et al. Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant *oprD* mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:20747–52.
- Gol'dberg ED, Masnaya NV, Churin AA. Immunity parameters in mice of different strains. *Bull Exp Biol Med* 2005;140:219–21.



02 Understanding the acute inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infection: differences between susceptible and multidrug-resistant strains in a mouse peritonitis model

01 Silvia Gómez-Zorrilla ^a, Laura Calatayud ^b, Carlos Juan ^c, Gabriel Cabot ^c, Fe Tubau ^b,
 02 Antonio Oliver ^c, Maria Angeles Dominguez ^b, Javier Ariza ^a, Carmen Peña ^{a,*}

^a Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Feixa Llarga s/n 08907, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^b Microbiology Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Feixa Llarga s/n 08907, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^c Microbiology Service, Hospital Universitario Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdiSpa), Ctra. Valldemossa 79, 07010 Palma de Mallorca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2016

Accepted 1 October 2016

Keywords:

High-risk clone

Antibiotic resistance

Tumour necrosis factor- α

Interleukin-6

Interleukin-10

Animal model

ABSTRACT

The increasing emergence of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* strains is associated with the spread of a few international epidemic clones called high-risk clones. The existence of a fitness cost associated with multidrug resistance remains unclear, and little is known about the host inflammatory response in acute *P. aeruginosa* infections. This study aimed to investigate how the inflammatory response occurs in the most relevant high-risk clones and to compare the process with that recorded in clinical susceptible isolates. Nine *P. aeruginosa* strains were studied, including the most relevant MDR high-risk clones (ST111, ST175 and ST235) circulating worldwide. The inflammatory response in terms of the release of interleukins in serum was investigated in a mouse peritonitis-sepsis model at three time points (4, 8 and 12 h). TNF α and interleukin-10 (IL-10) levels were significantly higher at all time points in mice inoculated with clinical susceptible strains compared with those inoculated with MDR strains. IL-6 levels were significantly higher in the clinical susceptible strain group at 8 h and 12 h ($P = 0.036$ and $P = 0.007$, respectively). Bacterial counts (log CFU/mL) in peritoneal fluid were higher in the clinical susceptible strain group compared with the MDR strain group at 8 h [6.00 (4.30–6.90) vs. 4.46 (3.30–5.34); $P = 0.005$] and 12 h [7.75 (4.00–7.97) vs. 4.04 (2.58–4.94); $P = 0.003$]. MDR *P. aeruginosa* strains elicited a weaker inflammatory response than susceptible strains in an experimental mouse model, suggesting the existence of a fitness cost associated with multidrug resistance.

© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a leading cause of nosocomial infections, particularly in critically ill and immunocompromised patients. *Pseudomonas aeruginosa* infections are often severe [1,2] and are difficult to treat because of their limited susceptibility to antimicrobial agents [3] and the frequent emergence of antibiotic-resistant mutants during therapy [4]. It is known that the severity of acute illness presentation is associated with higher mortality. Factors related to the host, organism and treatment determine the outcome of infection and mortality. Regarding the host, the severity of underlying disease

may be synergistic with infection due to resistant organisms [5]. Thus, pathogenesis is not only determined by *P. aeruginosa* virulence factors but also, and more importantly, by the interaction of the bacteria with the host immune system [6].

Although the host immune response plays a key role in *P. aeruginosa* infection, it has not been investigated in depth. Clinical research is limited by many factors that may modify the inflammatory response, such as age, co-morbidities or treatments with immunomodulatory effects [7]. Moreover, experimental studies focus on the host response to *P. aeruginosa* airway diseases [8–12], and little is known of the ability of *P. aeruginosa* to elicit an inflammatory response in systemic disease [13–15].

There have also been important changes in the epidemiology of *P. aeruginosa* in recent years. In addition to the characteristic polyclonal pattern of endogenous *P. aeruginosa*, a newly identified epidemic clonal pattern of multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* has been described. Several reports have provided strong evidence for the existence of MDR and extensively drug-resistant (XDR)

* Corresponding author. Infectious Diseases Service, Hospital Universitari de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), University of Barcelona, Feixa Llarga s/n 08907, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Fax: +34 93 260 76 37.

E-mail address: cpena@bellvitgehospital.cat (C. Peña).

P. aeruginosa high-risk clones [16,17], with biological parameters that may explain their success [18]. Experimental and clinical studies [5,13,19,20] suggest a possible association between the acquisition of resistance mechanisms and loss of virulence; nevertheless, some MDR *P. aeruginosa* display widely variable pathogenic characteristics, including hypervirulent strains [21].

In a recent study performed by our group, we evaluated the fitness cost of antibiotic resistance for *P. aeruginosa* using in vitro and in vivo experiments [20]. Impaired virulence of MDR strains was observed. Survival experiments demonstrated a higher capacity to produce mortality in susceptible strains compared with MDR strains in a mouse peritonitis model. However, the host immune response may be a determining element of the virulence of strains and it has not been widely studied. There are few reports in the literature on the correlation of MDR and XDR high-risk clones and their ability to elicit immune and pathogenic responses. Therefore, we decided to conduct new research to investigate the profile of the inflammatory reaction in *P. aeruginosa* infection and to assess whether there are differences in the pathogenicity of MDR and susceptible *P. aeruginosa* by evaluating the immune response to infection. Mainly, we wanted to analyse how the immune response occurs during infection with the most relevant clinical clones of MDR/XDR *P. aeruginosa* circulating worldwide and to compare the process with that observed in other clinical susceptible *P. aeruginosa* isolates. To this end, a mouse peritonitis-sepsis model was created by inoculating various *P. aeruginosa* strains and measuring the inflammatory response in terms of the release of interleukins in serum at different time points. Leucocyte and bacterial counts in peritoneal fluid were also determined, and the ability to develop bacteraemia was assessed.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Nine *P. aeruginosa* strains with different phenotypes, genotypes and resistance mechanisms were studied, including two reference strains (PAO1 and PA14) and seven clinical strains. The seven clinical strains comprised three clinical multisusceptible (multiS) strains, a non-clonal MDR strain, and three MDR high-risk clones (ST111, ST235 and ST175). Clinical strains were isolated from single patients with invasive *P. aeruginosa* infection. Antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms, molecular typing [pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST)] and the virulence determinants of the strains used have been reported elsewhere [20]. Phenotype stratification of the *P. aeruginosa* isolates was made in accordance with recent standard definitions [22]. MDR *P. aeruginosa* was defined as a strain non-susceptible to at least one agent in three or more antipseudomonal antimicrobial categories. XDR *P. aeruginosa* was defined as a strain non-susceptible to at least one agent in all but two or fewer antipseudomonal antimicrobial categories. Thus, XDR strains were also included as an MDR category, with MDR being divided into XDR and MDR non-XDR *P. aeruginosa*. Wild-type strains or strains susceptible to all antipseudomonal agents tested were considered multiS.

2.2. Mouse peritonitis-sepsis model

The experimental protocol was carried out in accordance with the European Directive (2010/63/EU) and Spanish legislation (RD 53/2013) on animal experimentation and was previously approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona (Barcelona, Spain). Experiments were conducted using female immunocompetent C57BL/6 mice (weight 18–21 g). Mice had access to food and water ad libitum and were housed five per cage under a 12 h light/dark cycle at 22 ± 2 °C with $50 \pm 10\%$ relative humidity.

The mouse peritonitis model originally described by Fridmodt-Møller was used [23] with slight modifications. This model had previously been standardised by our group for *P. aeruginosa* infection [20]. Briefly, the methodology consisted of intraperitoneal injection of 0.5 mL of *P. aeruginosa* inoculum containing 10^5 CFU/mL *P. aeruginosa* suspension in exponential growth phase diluted with 5% (w/v) porcine gastric mucin in sterile saline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), which was used as an adjuvant. Three time points (4, 8 and 12 h after inoculation) were defined and at each time point mice were anaesthetised with ketamine/xylazine 10:1 [100 mg/kg ketamine (Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain) and 10 mg/kg xylazine (Laboratorios Calier S.A., Barcelona, Spain)]. Peritoneal washing was then performed by injecting 2 mL of sterile saline, followed by a 1-min external massage of the abdomen. The abdomen was then opened and 1 mL of peritoneal fluid was recovered from the peritoneum using an aseptic technique. Afterwards, 0.5–0.8 mL of blood was withdrawn by cardiac puncture and the animals were then killed by cervical dislocation. Each strain was inoculated in groups of 15 animals and at each time point 5 mice were euthanised for every *P. aeruginosa* isolate. In addition, a group of 10 animals without infection was used as a control group.

2.3. Sample processing

Peritoneal fluid samples were used to determine bacterial and leucocyte counts in the peritoneal fluid. To study bacterial growth, peritoneal fluid samples were plated (0.1 mL) and diluted on 5% blood trypticase soy agar plates (Becton Dickinson, Madrid, Spain) to perform direct and 10-fold dilution cultures. The detection limit using this method was 10^1 CFU/mL. Leucocyte counts were performed in a Neubauer chamber (Thermo Fisher Scientific S.L., Barcelona, Spain) after diluting the peritoneal fluid sample (0.01 mL) with Türk's solution (1:2), which was used to haemolyse erythrocytes and allow easier visualisation of the leucocytes.

Blood samples from cardiac puncture were used to analyse the interleukin (IL) levels in serum and to assess bacteraemia. Tumour necrosis factor- α (TNF α), IL-6 and IL-10 levels in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (eBioscience, Vienna, Austria) for detection of mouse cytokines according to the manufacturer's instructions. Experiments were performed in duplicate. Qualitative blood cultures were also performed by culturing a blood sample in trypticase soy broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 24 h at 37 °C. Then, 0.1 mL of the cultured broth was plated in blood agar plates to check for *P. aeruginosa* growth.

2.4. Statistical analysis

The Shapiro–Wilk test was used to evaluate normality. Continuous variables were expressed as the median and interquartile range, as required by the distribution of the sample. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages. Statistical differences were examined by non-parametric statistical tests (Mann–Whitney *U*-test or Kruskal–Wallis test) for continuous variables, and the χ^2 or Fisher's exact test for categorical variables. All analyses were two-tailed and a *P*-value of <0.05 was considered statistically significant. Data were analysed using IBM SPSS Statistics v.19.0 (IBM Corp., Armonk, NY).

3. Results

3.1. Bacterial growth in peritoneal fluid

Data on bacterial counts in peritoneal fluid of the strains studied are shown in Table 1. At 4 h after *P. aeruginosa* inoculation, no statistically significant differences were observed in the bacterial counts

Table 1
Bacterial and leucocyte counts in peritoneal fluid (PF) and ability to produce bacteraemia of nine *Pseudomonas aeruginosa* strains studied in the mouse peritonitis model^a.

Resistance profile/strain	4 h			8 h			12 h		
	Bacterial count in PF (log CFU/mL)	Leucocyte count in PF ($\times 10^6$ cells/mL)	Bacteraemia (%)	Bacterial count in PF (log CFU/mL)	Leucocyte count in PF ($\times 10^6$ cells/mL)	Bacteraemia (%)	Bacterial count in PF (log CFU/mL)	Leucocyte count in PF ($\times 10^6$ cells/mL)	Bacteraemia (%)
Multisusceptible									
PA01	5.69 (5.61–6.09)	3.12 (2.38–5.20)	5 (100)	7.10 (6.88–7.23)	2.00 (1.46–2.88)	5 (100)	7.85 (7.42–8.32)	0.88 (0.46–1.92)	5 (100)
PA14	6.18 (5.76–6.32)	3.32 (2.38–5.20)	5 (100)	7.04 (6.65–7.23)	2.20 (2.16–3.70)	5 (100)	8.43 (8.20–8.62)	1.88 (1.56–2.52)	5 (100)
ST17	5.71 (4.37–5.80)	6.8 (2.40–10.4)	5 (100)	7.00 (6.63–7.15)	4.60 (3.48–7.48)	5 (100)	7.97 (7.50–8.27)	3.12 (1.78–4.32)	5 (100)
ST381	5.00 (4.42–5.15)	3.76 (2.38–5.52)	5 (100)	5.95 (5.84–6.15)	4.24 (2.12–8.72)	5 (100)	7.92 (7.16–8.06)	6.00 (1.24–7.60)	5 (100)
ST1707	5.23 (5.00–5.39)	3.28 (3.08–3.44)	5 (100)	3.90 (3.21–5.23)	8.40 (5.72–9.40)	4 (80)	3.60 (3.09–4.01)	1.68 (0.94–4.44)	3 (60)
MDR non-XDR									
ST274	6.02 (5.68–6.30)	1.68 (1.38–3.22)	5 (100)	4.43 (4.12–5.49)	6.72 (3.98–8.74)	5 (100)	3.78 (3.53–5.16)	5.04 (3.12–11.56)	3 (60)
ST111	5.13 (3.57–5.30)	1.36 (1.04–2.92)	3 (60)	5.32 (4.20–6.18)	8.72 (5.68–8.80)	5 (100)	4.17 (3.27–5.37)	11.60 (9.00–12.80)	3 (60)
XDR									
ST235	4.50 (4.08–4.74)	2.60 (2.12–2.82)	5 (100)	5.32 (3.90–5.53)	1.80 (1.54–2.50)	5 (100)	4.95 (4.41–6.48)	3.08 (2.92–3.16)	5 (100)
ST175	3.70 (2.63–3.84)	2.88 (2.30–9.14)	4 (80)	3.07 (1.87–3.33)	9.8 (5.00–15.80)	5 (100)	2.27 (1.63–2.53)	5.4 (0.46–6.60)	1 (20)

MDR, multidrug-resistant; XDR, extensively drug-resistant.
^a Data expressed as the median (interquartile range).

in peritoneal fluid between mice inoculated with clinical multiS strains and mice inoculated with MDR/XDR strains, although higher concentrations were observed in the former group [5.23 (4.48–5.50) log CFU/mL vs. 4.52 (3.74–5.56) log CFU/mL; $P = 0.18$]. At 8 h after inoculation, bacterial counts in peritoneal fluid were significantly higher in mice inoculated with clinical multiS strains than in those inoculated with MDR/XDR strains [6.00 (4.30–6.90) log CFU/mL vs. 4.46 (3.30–5.34) log CFU/mL; $P = 0.005$]. Differences were even more marked at 12 h after *P. aeruginosa* inoculation [7.75 (4.00–7.97) log CFU/mL vs. 4.04 (2.58–4.94) log CFU/mL; $P = 0.003$]. Bacterial counts in peritoneal fluid of mice inoculated with reference multiS strains (PA01 and PA14) were higher than in those inoculated with clinical multiS strains [6.03 (5.62–6.21), 7.07 (6.84–7.26) and 8.32 (7.79–8.44) log CFU/mL at 4, 8 and 12 h, respectively].

3.2. Ability to produce bloodstream infection

Data on the ability of the nine *P. aeruginosa* strains studied to produce bacteraemia are shown in Table 1. No differences were observed between clinical multiS and MDR/XDR strains at the three time points studied, although a trend towards statistical significance was observed 12 h after inoculation [13/15 (87%) mice infected by clinical susceptible strains vs. 12/20 (60%) in those inoculated with MDR/XDR strains; $P = 0.087$]. When reference multiS strains were included in the analysis, statistical differences were recorded at 12 h of inoculation [multiS strains 23/25 (92%) vs. MDR/XDR strains 12/20 (60%); $P = 0.01$] and a trend towards significance was observed at 4 h after inoculation [25/25 (100%) vs. 17/20 (85.0%); $P = 0.08$]. However, no significant differences were found at 8 h.

3.3. Leucocyte counts in peritoneal fluid

Table 1 shows the results of leucocyte counts in peritoneal fluid. In the first hours of infection, mice inoculated with clinical multiS strains showed higher counts than MDR/XDR strains [3.60×10^6 (3.04×10^6 – 5.60×10^6) vs. 2.42×10^6 (1.47×10^6 – 2.87×10^6); $P = 0.008$]. These differences were not observed at 8 h after inoculation [6.56×10^6 (3.92×10^6 – 8.40×10^6) vs. 6.40×10^6 (2.76×10^6 – 8.80×10^6); $P = 0.96$]. Moreover, at 12 h after infection mice inoculated with multiS strains showed a trend towards leukopenia, whilst in those inoculated with MDR/XDR strains leucocyte counts remained high [1.84×10^6 (1.32×10^6 – 6.00×10^6) vs. 5.08×10^6 (2.99×10^6 – 9.10×10^6); $P = 0.06$].

3.4. Cytokine levels in serum

TNF α levels were significantly higher at all time points in mice inoculated with clinical multiS strains compared with MDR/XDR strains [453.38 (368.50–565.00) pg/mL vs. 232.44 (186.84–272.81) pg/mL, $P = 0.001$, at 4 h; 392.98 (265.20–1021.84) pg/mL vs. 156.08 (106.09–291.11) pg/mL, $P = 0.003$, at 8 h; and 436.56 (67.96–2351.02) pg/mL vs. 79.10 (48.43–191.78) pg/mL, $P = 0.004$, at 12 h]. Differences were also observed when comparing all multiS strains, including reference isolates, with MDR/XDR strains ($P = 0.001$ at 4, 8 and 12 h). TNF α levels were undetectable in serum from uninfected control mice. TNF α levels and the temporal pattern of release of TNF α are shown in Fig. 1A.

Clinical multiS strains induced higher IL-6 levels than MDR/XDR isolates at 4 h after inoculation, but the difference was not statistically significant [11,547.34 (4192.40–25,051.30) pg/mL vs. 6304.86 (3901.08–8952.96) pg/mL; $P = 0.139$]. However, differences were found at 8 h [51,601.60 (2681–61600) pg/mL vs. 4751.06 (1985.55–11,198.33) pg/mL; $P = 0.036$] and 12 h after infection [29,292.00 (2617.84–61,600) pg/mL vs. 731.67 (224.14–8480.00) pg/mL; $P = 0.007$]. Differences were even more notable when the two reference multiS strains ($P = 0.025$ at 4 h and $P < 0.001$ at 8 h and

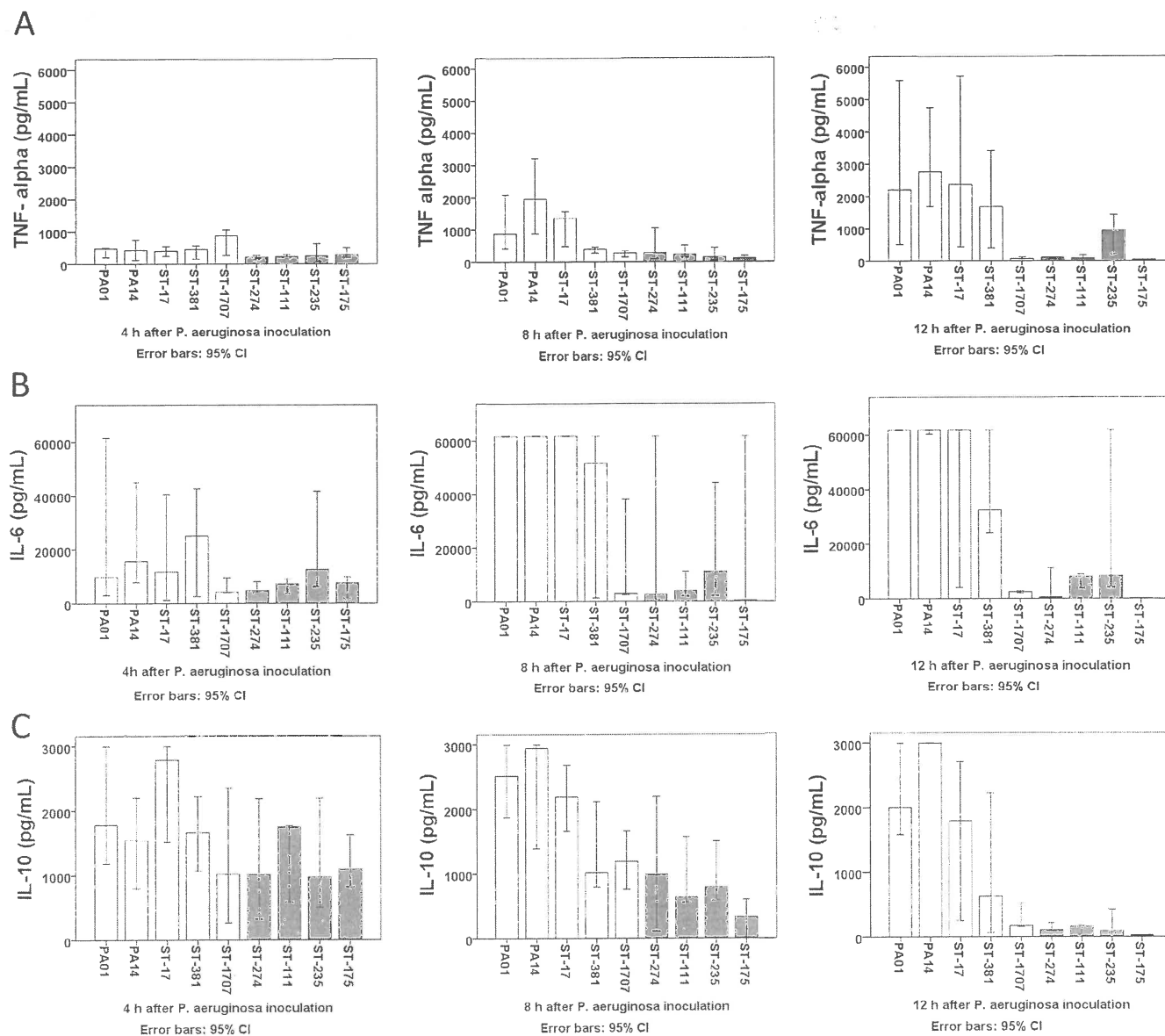


Fig. 1. Temporal pattern of cytokine release in serum during *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse peritonitis model. Time 0 represents the moment of intraperitoneal inoculation of *P. aeruginosa* strains. Cytokine levels are expressed as median and 95% confidence interval. White boxes, susceptible *P. aeruginosa* isolates; black boxes, multidrug-resistant/extensively drug-resistant (MDR/XDR) *P. aeruginosa* isolates. (A) Tumour necrosis factor- α (TNF α) levels were higher at all time points in mice inoculated with clinical susceptible strains compared with MDR/XDR strains at 8 h ($P=0.036$) and 12 h ($P=0.007$); no differences were observed at 4 h ($P=0.139$). (B) Interleukin-6 (IL-6) levels were higher in mice inoculated with clinical susceptible strains compared with MDR/XDR strains ($P=0.001$, 0.003 and 0.004 at 4, 8 and 12 h, respectively). (C) IL-10 levels were higher at all time points in mice inoculated with clinical susceptible strains compared with MDR/XDR strains ($P=0.014$, 0.001 and <0.001 at 4, 8 and 12 h, respectively).

12 h) were included in the analysis. Once again, all controls without infection had undetectable levels of IL-6 in serum. Data of levels and temporal patterns of IL-6 release are displayed in Fig. 1B.

Regarding IL-10, higher levels were observed in mice infected with clinical multiS strains than in those infected with MDR/XDR strains at all time points [1661.34 (1074.92–2357.64) pg/mL vs. 995.88 (665.41–1729.95) pg/mL, $P=0.014$, at 4 h; 1659.34 (841.26–2117.88) pg/mL vs. 638.56 (442.89–992.49) pg/mL, $P=0.001$, at 8 h; and 524.46 (174.30–1798.20) pg/mL vs. 97.42 (44.55–173.34) pg/mL, $P<0.001$, at 12 h]. Once again, significant differences were found when comparing all of the multiS strains (including reference strains) with MDR/XDR strains ($P=0.004$ at 4 h and $P<0.001$ at 8 h and 12 h

after inoculation). All control mice had undetectable levels of IL-10 in serum. The temporal pattern of IL-10 release is shown in Fig. 1C.

4. Discussion

Despite the high prevalence of *P. aeruginosa*, the host immune response to *P. aeruginosa* infection remains poorly characterised. Moreover, data on the correlation between the resistance profile of *P. aeruginosa* and its ability to elicit an inflammatory response are limited. We created an experimental animal model to investigate the pathogenicity of *P. aeruginosa* in terms of the inflammatory

response. Several *P. aeruginosa* strains with different resistance patterns were used, including the three most common high-risk clones.

It is known that sepsis is associated with production both of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and that the intensity of this inflammatory response is related to the outcome of infection [7,24,25]. Several researchers have shown that the levels of both types of cytokine may be correlated with illness severity and that an imbalanced inflammatory response is a strong predictor of mortality [7,25]. In this experimental model of mouse peritonitis-sepsis, the following findings were observed. First, systemic cytokine activation was universal. Second, the concentration both of pro- and anti-inflammatory cytokines rose early. Third, although in general concentrations were higher in multiS strains, the circulating cytokine response was heterogeneous, since similar phenotypes had different patterns of cytokine response. Finally, immunological dissonance, defined as a preponderance of either pro- or anti-inflammatory cytokine activation [26], was not common in this experimental study, nor it was observed in a previous clinical study [27].

Innate immune cells represent the first line of defence following an infection and they play a central role in the control of pathogens and the initiation of an adaptive immune response. Recruitment of neutrophils is a major component of the protective host response to *P. aeruginosa* and appears to outweigh the contributions of other immune cells [28]. In the current study, leucocyte recruitment in peritoneal fluid was initially similar in the two phenotypes; however, at 12 h after inoculation a trend towards lower leucocyte recruitment and a significantly higher bacterial count in peritoneal fluid of multiS infection was observed. Recent studies [29] have shown that neutrophil function is altered after sepsis, with impaired bacterial clearance and decreased recruitment in infected tissue. At this point, we might speculate that a decrease in the number of neutrophils and a higher bacterial count in peritoneal fluid are signs of the host defences' inability to control infection locally and to clear bacteria.

The severity of sepsis is determined by an excessive inflammatory response [24]. In this regard, determination of interleukin levels in serum is useful to evaluate the outcome and severity of the infection [25,30]. We studied two of the classically associated pro-inflammatory cytokines of sepsis (TNF α and IL-6) and the most relevant anti-inflammatory cytokine (IL-10). TNF α is a primary mediator of the innate response that is necessary for an effective defence against *P. aeruginosa* [9]. Most studies [9–11] suggest that TNF α plays an important role in innate immunity and its production appears to be critical in bacterial clearance from the lung, although the magnitude of this effect is relatively modest in almost all studies. In fact, we also found that mice inoculated with susceptible strains had significantly higher levels of TNF α than MDR strains, but generally a worse bacterial clearance, as discussed above. Another pro-inflammatory cytokine (IL-6) behaved in a similar way to TNF α , with significantly higher levels in mice inoculated with clinical multiS strains than in those inoculated with MDR/XDR strains. Previous studies suggest that serum levels of these cytokines are closely related to the severity and outcome of sepsis [25].

Previous studies of *P. aeruginosa* pulmonary infection suggest that IL-10 production peaks come relatively late, at a time when pro-inflammatory cytokines are diminishing [31]. However, in the current study we observed high levels of IL-10 at the first time point (4 h), with a tendency towards a slow decrease at 8–12 h after inoculation. Although it is accepted that in sepsis a pro-inflammatory response predominates in the early stages and an anti-inflammatory response in the later stages, several studies suggest that the secretion both of pro- and anti-inflammatory cytokines occurs in a simultaneous manner from the very first moment of infection [7,25,32].

In general, this study showed that the inflammatory response, measured as release of interleukins, was higher in infections caused

by susceptible strains than in infections by MDR strains. Despite the greater inflammatory response, bacterial counts in peritoneal fluid and bacteraemia were higher in susceptible *P. aeruginosa* strains, suggesting a failure to control the infection and a worse outcome. In fact, in a recent study conducted by our group involving a mouse peritonitis model, we demonstrated that mortality was higher in mice inoculated with susceptible *P. aeruginosa* strains than in those inoculated with MDR strains [20]. This might be explained by a greater virulence of the susceptible strains. However, the present study also provides evidence that the pathogenicity of *P. aeruginosa* strains may differ among strains with a similar phenotype. This is because *P. aeruginosa* pathogenicity not only depends on the fitness cost of resistance, but also on the expression of different virulence factors. In fact, we observed that the behaviour of the ST1707 strain, susceptible to all antipseudomonal antibiotics, is similar to MDR strains with regard both to the inflammatory response profile and the ability to produce secondary bacteraemia. Moreover, the behaviour of the ST235 strain remains almost as virulent as that of susceptible strains, with a similar immune response, ability to develop bacteraemia and mortality [20] despite exhibiting a high proportion of resistance mutations. In fact, in our previous study we observed that the ST235 strain was the only strain among the MDR/XDR isolates that caused mortality in the mouse peritonitis model. Previous studies have demonstrated that ST235 is associated with the *exoU* genotype, which is considered as a major virulence determinant of *P. aeruginosa* [20,33]. The presence of this and other virulence parameters may impact even more than the resistance phenotype in the host response and in the outcome of infection. We observed that strains in which IL-6 and TNF α persisted throughout the 12 h showed a greater ability to cause bacteraemia, independently of the phenotype. Therefore, our findings also suggest that differences in the inflammatory responses may not depend solely on the resistance profile and the fitness cost of resistance; the expression of biological determinants associated with certain genotypes also affects the virulence of *P. aeruginosa* and the magnitude of the interaction of the bacteria with the immune system.

This study has several limitations. First, circulating levels of cytokines were measured at 4, 8 and 12 h, which may have limited the ability to explore whether more time-sensitive patterns existed. Second, the sample size was small and the differences in the ability of the two phenotypes to produce bloodstream infection were not clearly significant. Third, the circulating concentrations of three cytokines were studied as biomarkers of the immune response in a mouse peritonitis-sepsis model. Analysis of a larger number of biomarkers would have provided a more comprehensive view of how the inflammatory response occurs in this model. Finally, the use of mucin as adjuvant may have modified the inflammatory response of mice. However, even if this occurred, the variation due to its use would have been homogeneous as the same dose of mucin was used in all groups.

5. Conclusions

In conclusion, here we describe the systemic cytokine response to peritonitis infection and secondary bacteraemia in an experimental model. The response elicited by susceptible *P. aeruginosa* strains was generally higher than MDR strains, but even strains with a similar resistance phenotype may elicit different responses. One particularly interesting finding is the variability of bacterial factors that alter and modulate the host immune response following infection. Although these data suggest the existence of a fitness cost associated with multidrug resistance, the magnitude of the inflammatory response is not only a result of the resistance phenotype but rather also of the virulence phenotype. The expression of virulence factors not only affects the virulence

of *P. aeruginosa* but also alters the magnitude of the host–pathogen interaction.

Acknowledgments

The authors would like to thank Maria Eugenia Pachón-Ibáñez (Institute of Biomedicine of Seville, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain) for guidance on performing the animal model. The authors also thank Michael Maudsley (Language Advisory Service, University of Barcelona, Barcelona, Spain) for checking the English.

Funding: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III [grants FIS 11/00164 and P112/00103] and was co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF) 'A way to build Europe'. This study was also supported by the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases [REIPI, RD15/0008] and the CIBER de Enfermedades Respiratorias [CB06/06/0037].

Competing interests: None declared.

Ethical approval: This study complied with the European Directive [2010/63/EU] and Spanish legislation [RD53/2013] on animal experimentation and was approved by the Ethical Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona (Barcelona, Spain) [ref. no. 456/13].

References

- [1] Kang CI, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh MD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis* 2003;37:745–51.
- [2] Vidal F, Mensa J, Almela M, Martínez JA, Marco F, Casals C, et al. Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, with special emphasis on the influence of antibiotic treatment. Analysis of 189 episodes. *Arch Intern Med* 1996;156:2121–6.
- [3] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634–40.
- [4] Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1379–82.
- [5] Peña C, Suarez C, Gozalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1265–72.
- [6] Rumbaugh KP, Colmer JA, Grisnold JA, Hamood AN. The effects of infection of thermal injury by *Pseudomonas aeruginosa* PA01 on the murine cytokine response. *Cytokine* 2001;16:160–8.
- [7] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013;13:260–8.
- [8] Gellatly SH, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 2013;67:159–73.
- [9] Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1209–23.
- [10] Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: host defense in lung diseases. *Respirology* 2010;15:1037–56.
- [11] Lavoje EG, Wangdi T, Kazmierczak BI. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect* 2011;13:1133–45.
- [12] Giamarellos-Bourboulis EJ, Tzepl I, Tsovolou I, Spyridaki A, Tzaganos T, Vaki I, et al. Impact of multidrug resistance on experimental empyema by *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiration* 2011;82:46–53.
- [13] Giamarellos-Bourboulis EJ, Plachouras D, Tzivra A, Kououlas V, Bolanos N, Raftogiannis M, et al. Stimulation of innate immunity by susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro and in vivo study. *Clin Exp Immunol* 2004;135:240–6.
- [14] Giamarellos-Bourboulis EJ, Kousoulas V, Panagou C, Adamis T, Baziaka F, Skiadas I, et al. Experimental sepsis using *Pseudomonas aeruginosa*: the significance of multi-drug resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:357–61.
- [15] Koussoulas V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Adamis T, Moutktaroudi M, Sabracos L, Perrea D, et al. The significance of oxidant/antioxidant balance for the pathogenesis of experimental sepsis by multidrug-resistant *P. aeruginosa*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;72:41–7.
- [16] Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 2015;21–22:41–59.
- [17] Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:6349–57.
- [18] Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Zamorano L, Juan C, et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5527–35.
- [19] Abdelraouf K, Kabbara S, Ledesma KR, Poole K, Tam VH. Effect of multidrug resistance-conferring mutations on fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1311–17.
- [20] Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, Tubau F, Camoetz M, Oliver A, et al. Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47:368–74.
- [21] Carter MEK, Fothegill JL, Walshaw MJ, Rajakumar K, Kadioglu A, Winstanley C. A subtype of a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis epidemic strain exhibits enhanced virulence in a murine model of acute respiratory infection. *J Infect Dis* 2010;202:935–42.
- [22] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
- [23] Frimodt-Møller N. The mouse peritonitis model: present and future use. *J Antimicrob Chemother* 1993;31(Suppl. D):55–60.
- [24] Ulloa L, Tracey KJ. The 'cytokine profile': a code for sepsis. *Trends Mol Med* 2005;11:56–63.
- [25] Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:609–34.
- [26] Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996;125:680–7.
- [27] Kellum JA, Kong L, Fink MP, Weissfeld LA, Yealy DM, Pinsky MR, et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch Intern Med* 2007;167:1655–63.
- [28] Mizgerd JP. Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. *Immunology* 2002;14:123–32.
- [29] Delano MJ, Thayert T, Gabrilovich S, Kelly-Scumpia KM, Winfield R, Scumpia PO, et al. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J Immunol* 2011;186:195–202.
- [30] Roberston CM, Coopersmith CM. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes Infect* 2006;8:1382–9.
- [31] Wolbeling F, Munder A, Kerber-Momot T, Neumann D, Hennig C, Hansen G, et al. Lung function and inflammation during murine *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Immunobiology* 2011;216:901–8.
- [32] van der Poll T. Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect Dis* 2001;1:165–74.
- [33] Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2015;60:539–48.

ANEXO II. Formularios de recogida de datos

Anexo II.a. Protocolo del estudio prospectivo

No Protocolo
 No Infección
 Fecha de Infección
 Infección por P.aeruginosa

SAPS II score 24 horas previas a la infección

FACTORES EXTRÍNSECOS (7días previos a infección)

Cateter venoso Ventilación mecánica
 Sonda vesical Nutrición enteral
 Cateter uretral Nutrición parenteral
 Neofrostomía Cirugía (3meses previas)

FOCO DE LA INFECCIÓN

Foco
 Otros (Especificar)
 Bacteriemia

CLÍNICA INICIAL (24horas iniciales)

SIRS TNF
 Sepsis grave IL-6
 Shock séptico IL-10
 Síndr. disfunción multiorgánica PCR
 SOFA score
 PITT score

RESPUESTA INFLAMATORIA INICIAL

REPERCUSIÓN CLÍNICA (Valoración a las 48horas)

SIRS
 Sepsis grave SOFA score
 Shock séptico PITT score
 Síndr. disfunción multiorgánica

RESPUESTA INFLAMATORIA A LAS 48 HORAS

TNF
 IL-6
 IL-10
 PCR

TRATAMIENTO NO ANTIBIÓTICO

Retirada de cateter
 Drenaje percutáneo
 Drenaje Quirúrgico

EVOLUCIÓN

Curación
 Recaida
 Exitus
 Exitus atribuible

ANTIBIOTICOTERAPIA EMPÍRICA

No ATB ATB empírico Fecha inicio Fecha final
 Aprobado

ANTIBIOTICOTERAPIA DIRIGIDA

No ATB ATB dirigido Fecha inicio Fecha final

ENFERMEDAD DE BASE:

- **Diabetes mellitus:** DM en tratamiento con ADO o insulina
- **EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, Bronquiectasias u otras neumopatías crónicas.
- **Neoplasia sólida:** Neoplasia sólida diagnosticada en los últimos 5 años o en tratamiento (aunque sea paliativo)
- **Neoplasia hematológica:** Criterios iguales anteriores pero para hematológicos.
- **IRC:** Insuficiencia renal crónica con TFG ≤ 60 ml/min o en diálisis de cualquier tipo, de >3 meses de evolución.
- **Cirrosis:** Hepatopatía crónica con criterios AP y/o clínicos
- **Enfermedad neurológica discapacitante**
- **Insuficiencia cardiaca:** NYHA III-IV
- **Neutropenia ≤ 500 o ≤ 100 :** Neutropenia (no como consecuencia de la sepsis)
- **Inmunodeficiencia:** Congénita o SIDA (CD4 <200)
- **Inmunosupresión:** QT, RT, corticoides > 10 mg/día de prednisona o equivalente o terapias biológicas en los 3 meses previos; Tx órgano sólido o Tx progenitores hematopoyéticos.

ÍNDICE COMORBILIDAD CHARLSON

Enfermedades	Puntuación
<ul style="list-style-type: none"> - Infarto de miocardio/Enf. coronaria - Insuficiencia cardiaca congestiva - Enf. vascular periférica - Enf. cerebrovascular - Demencia - Enf. pulmonar crónica - Enf. tejido conectivo - Enf. ulcerosa (ulcus péptico) - Enf. hepática leve (sin hipertensión portal, incluye hepatopatía crónica) - Diabetes mellitus sin afectación de órgano diana 	1
<ul style="list-style-type: none"> - Hemiplejia - Enf. renal moderada o severa - DM con afectación órgano diana (retinopatía, nefropatía...) - Tumor sin M1 (excluir si >5 años desde Diagnóstico y no tto activo) - Leucemia (Aguda o Crónica) - Linfoma 	2
<ul style="list-style-type: none"> - Enf. hepática severa 	3
<ul style="list-style-type: none"> -Tumor sólido metastásico - SIDA (no incluye únicamente VIH+) 	6

COLONIZACIÓN/INFECCIÓN POR *P.aeruginosa*:

- PA-S:** PA sensible, se permite resistencia a ≥ 1 fármaco en ≤ 3 familias de antibióticos.
- **PA-MDR: Multidrug-resistant PA.** PA resistente a ≥ 1 antibiótico en ≥ 3 familias de antibióticos diferentes
- PA-XDR: Extensively-drug resistant PA.** PA resistente a ≥ 1 antibiótico en todas las familias de antibióticos excepto ≤ 2 .

Antimicrobial category	Antimicrobial agent
Aminoglycosides	Gentamicin
	Tobramycin
	Amikacin
	Netilmicin
Antipseudomonal carbapenems	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem
Antipseudomonal cephalosporins	Ceftazidime
	Cefepime
Antipseudomonal fluoroquinolones	Ciprofloxacin
	Levofloxacin
Antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid
	Piperacillin-tazobactam
Monobactams	Aztreonam
Phosphonic acids	Fosfomicin
Polymyxins	Colistin
	Polymyxin B

REPERCUSIÓN CLÍNICA:

- **Sepsis:** SIRS (Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) secundario a proceso infeccioso.

Criterios diagnósticos:

- Tª > 38°C o < 36° C
- FC > 90l/min
- FR > 20r/m o PaCO2 < 32mmHg
- Leucocitosis > 12.000/mm³ o leucopenia < 4.000/mm³ o > 10% cél. Inmaduras

- **Sepsis grave:** Sepsis asociada a:

- 1) Disfunción de un órgano
- 2) Hipoperfusión (Acidosis láctica, oliguria, encefalopatía/alt. mental)
- 3) Hipotensión que mejora tras admnón de líquido iv

- **Shock séptico:** sepsis asociada a hipotensión que no revierte con liquido iv y/o necesita fármacos vasopresores + alguno de los criterios de sepsis grave.

- **Síndrome disfunción multiorgánica (SDOM):** (Ver SOFA). Disfunción en ≥ 2 órganos durante ≥ 24 horas secundario a la infección:

- Crit. Cardiovascular: TAS < 90 ó requerimiento vasopresor
- Criterio renal: Diuresis < 500ml/d ó Creatinina > 265mmol/L
- Criterio respiratorio: aprox PaO₂/FiO₂ < 250
- Crit Hematológico: plaquetas < 80.000 o alteración coagulación
- Crit. Metabólico: pH < 7.3, lactato > 1.3 veces
- Crit. Hepático: Bb > 31mmol/L o transaminasas x 2.
- Crit. NRL: Alt mental/Coma
- Crit GI: Ulceras estrés.

SCORE DE SOFA

SISTEMA ORGÁNICO	0	1	2	3	4
Respiratorio Relación PaO ₂ /FiO ₂	> 400	400	300	200 con VAM	100 con VAM
Renal Creatinina, Diuresis	< 100	117 - 170	171 - 299	300 - 440 < 0.5 L/día	> 440 < 0.7 L/día
Hepático Bilirrubina sérica, (mg/dl, mmol/l)	< 1.2 < 20	1.2 - 1.9 21 - 32	2.0 - 5.9 33 - 101	6.0 - 11.9 102 - 204	11.9 > 204
Cardiovascular Hipotensión	No	PAM < 70	Dopamina 5 g/kg/ ó Dobutamina	Dopamina > 5 Epinefrina 0.1 Norepinefrina 0.1	Dopamina 5 Epinefrina > 0.1 Norepinefrina 0.1
Hematológico Plaquetas	> 150	150	100	50	20
Neurológico Escala de coma de Glasgow	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6

ÍNDICE PITT

Fiebre - ≤35° ó ≥40° - 35.1-36 ó 39-39.9 -36.1-38.9	2 1 0
Hipotensión - Disminución TAS>30mmHg y TAS >20mmHg ó requerimiento de drogas vasoactivas iv ó TAS <90mmHg	2
Ventilación mecánica	2
Parada cardíaca	4
Estado mental -Alerta -Desorientado -Estuporoso -Comatoso	0 1 2 4

GLASGOW

APERTURA OJOS	RESPUESTA VERBAL	RESPUESTA MOTORA
Espontánea 4 A la voz 3 Al dolor 2 Ninguna 1	Orientado 5 Confuso 4 Inapropiada 3 Incomprensible 2 Ninguna 1	A órdenes 6 Localiza dolor 5 Retirada ante dolor 4 Flexión inapropiada 3 Extensión 2 Ninguna 1

Mortalidad global: por cualquier causa en los 30 días después de la infección.

Mortalidad atribuible: en los primeros 7 días después de la infección y a una vez excluidas otras causas.

BACTERIEMIA POR *Pseudomonas aeruginosa*

Nombre(iniciales)..... N° protocolo.....Código hospital.....
Sexo V / M Edad I_I_I_I Sensibilidad *P.aeruginosa*: 1: no-MDR 2:MDR 3: XDR
Adquisición: 1 Comunidad 2 Asociado sistema de salud: ~ ingreso hospital (3 meses previos) ~ hemodiális ~ consultas externa ~ centro sociosanitario ~ hospitalización domicilio (30 días previos) 3 Nosocomial
Servicio (~ Medico ~ Quirúrgico ~ UCI [Gravedad enfermedad: SAPS score I_I_I]
~ Neonatos ~ Pediatría)
Fecha ingreso/...../..... Fecha hemocultivos...../...../.....

Enfermedad de base

~ Dabetes ~ EPOC ~ Cardiopatía ~ Neo sólida ~ Neo hematológica ~ IRC
~ Neurológica discapacitante ~ Cirrosis ~ SIDA ~ Tratamiento inmunosupresor
~ Neutropenia (~ 100 ~ 500)

Índice Charlson.....I_I_I

Factores extrínsecos-Procedimientos invasivos

~ C.venoso (48 horas previas) ~ S.urinaria ~ catéter ureteral ~ nefrostomía ~ V.mecánica
~ Nutrición enteral ~ Nutrición parenteral total (7 días previos)
~ Cirugía (3 meses previos)

Antibióticos previos (3 meses previos)

Antibióticoprevio1.....inicio/...../...../ final/...../...../
Antibióticoprevio2.....inicio/...../...../ final/...../...../

Foco de la bacteriemia

Origen: 1 Cateter 2 Desconocido/endógena 3 Urinario 4 ILQ/Intrabdominal 5 Biliar
6 Respiratorio 7 Osteoarticular 8 Partes blandas 9 Otras.....

Clínica

~ Fiebre >39° ~ T^a < 35° ~ Shock ~ S.disfunción multiorgánica ~ Leucos > 12.000 ~
Leucos < 4.000 ~ Neutropenia

Índice de Pitt (día de la bacteriemia)..... I_I_I

Tratamiento antibiótico empírico

Antibióticoempírico1.....inicio/...../...../ final/...../...../
Antibióticoempírico2.....inicio/...../...../ final/...../...../
Tratamiento antibiótico empírico ~ Apropiado ~ Inapropiado

Repercusión clínica (valoración a las 48h de la clínica de bacteriemia y/o previo al tto definitivo)

~ sepsis ~ sepsis grave ~ shock séptico ~ síndrome de disfunción multiorgánica ~ sin repercusión sistémica

Tratamiento antibiótico dirigido

Antibiócodirigido1.....inicio/...../...../ final/...../...../
Antibiócodirigido2.....inicio/...../...../ final/...../...../

Demora inicio tratamiento antibiótico adecuado (días).....I_I_I

Tratamiento no antibiótico (48 horas post-bacteriemia)

~ Retirada catéter ~ Drenaje percutáneo ~ Drenaje quirúrgico

Evolución

~ Curación clínica ~ Fracaso microbiológico (hemocultivos (+) 3º día de tratamiento adecuado)
~ Recaida ~ Exitus (30días) [~ Exitus relacionado (5 días)]

Anexo II.c. Protocolo recogida de neumonías asociadas a ventilación mecánica

Nº Protocolo _____
 iniciales _____
 Edad _____
 Fecha Nacimiento ____/____/____
 Sexo M / F

Fecha ingreso Hospital ____/____/____
 Fecha ingreso UCI ____/____/____
 Fecha IOT-VM ____/____/____
 Fecha NAV ____/____/____

SAPS II INGRESO
 CHARLSON

ENFERMEDAD BASE

- DM
 EPOC
 ICC
 Neo sólida
 Neo hematológica
 IRC

- Enf. Neurológica discapacitante
 Cirrosis
 Inmunodeficiencia
 Tto inmunodepresor
 Neutropenia <500

NAV

- CPIS (día de diagnóstico NAV)
 SAPS II (día de diagnóstico NAV)
 SIRS
 Sepsis grave
 Shock séptico
 Sínd. Distensión multiorgánica

BAL

- PA-S
 PA-MDR
 PA-XR

COLISTINA PREVIA

- DOSIS*:
 -Adecuada
 (2UI/8h si f(x) renal normal)
 -Baja

	Fecha inicio	Fecha final
Inhalada		
iv		

ATB EMPIRICO

- Nº * Fecha inicio Fecha final
 1) _____ /____/____ /____/____
 2) _____ /____/____ /____/____
 3) _____ /____/____ /____/____

* Si tto con colistina iv anotar dosis de colistina (UI/h) y función renal (Creatinina)

ADECUADO → Si/No

*Si colistina endovenosa: Dosis → Adecuada/ Baja

RESPUESTA CLÍNICA

- Curación
 Mejoría clínica
 Fracaso clínico
 Recurrencia

RESPUESTA MICROBIOLÓGICA

- Eradicación
 Persistencia
 Recurrencia
 Tiempo erradicación ____/____/____
 (Fecha 1ª muestra negativa)

EVOLUCIÓN

- Mortalidad precoz atribuible (7 día)
 Mortalidad (30 días)

ATB DIRIGIDO

- Nº Fecha inicio Fecha fin
 1) _____ /____/____ /____/____
 2) _____ /____/____ /____/____
 3) _____ /____/____ /____/____
 Si colistina endovenosa: Dosis → Adecuada/Baja

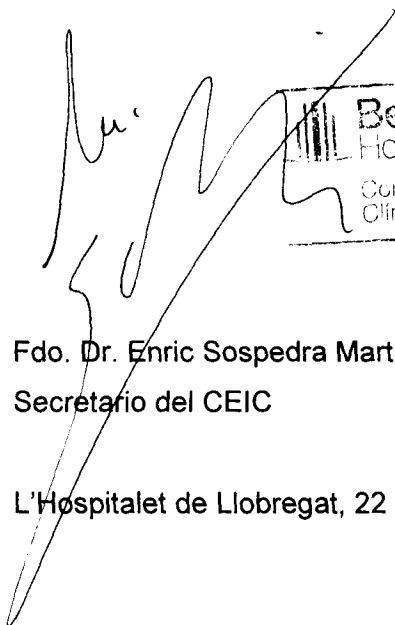

ANEXO III. Documentación Comités Éticos

**INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
SOBRE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari de Bellvitge, en su reunión de fecha 22 de Diciembre de 2011 (Acta 22/11), tras examinar toda la documentación presentada sobre el proyecto de investigación con nuestra ref. **PR308/11**, titulado:

“ESTUDIO CLÍNICO Y EXPERIMENTAL DE LA PATOGENICIDAD DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE A LOS CARBAPENÉMICOS EN PACIENTES CRÍTICOS”

Presentado por la Dra. Carmen Peña Miralles del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari de Bellvitge – Fundació IDIBELL, como investigadora principal, ha acordado emitir **INFORME FAVORABLE** al mencionado proyecto.

Fdo. Dr. Enric Sospedra Martínez
Secretario del CEIC

L'Hospitalet de Llobregat, 22 de Diciembre de 2011





COMITÈ ÈTIC D'EXPERIMENTACIÓ ANIMAL (CEEA)
Formulari d'acceptació de procediments

DADES PROCEDIMENT

Títol: Evaluación de la virulencia, respuesta inflamatoria y mortalidad de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con distintos grados de resistencia antimicrobiana mediante un modelo de peritonitis-sepsis en ratón.

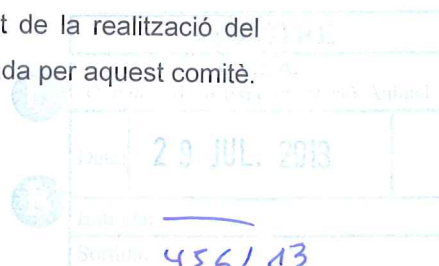
Investigador Responsable: **Silvia Gómez-Zorrilla Martín**

Un cop examinada la documentació presentada, en compliment del Decret 214/97 de la Generalitat de Catalunya, el CEEA de la UB ha resolt **ACCEPTAR** el procediment sol·licitat.

Signat pels membres del CEEA que han pres l'acord

Barcelona, 27 de juny del 2013

NOTA: El CEEA delega en el/la responsable en benestar animal de la Unitat d'Experimentació Animal on s'allotjaran els animals, el seguiment de la realització del procediment d'acord amb el que està establert a la memòria aprovada per aquest comitè.





RESOLUCIÓ

Assumpte: autorització de procediment d'experimentació núm. 7312

Identificació de l'expedient

Resolució per a la realització de procediments d'experimentació sol·licitat pel centre **UB-Estabulari Bellvitge**, a l'empara del Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

Antecedents

1. El centre va presentar sol·licitud d'autorització expressa per a l'execució del procediment d'experimentació que es relaciona tot seguit, atès que en principi es troba inclòs en algun dels supòsits establerts a l'article 34 del Decret 214/1997:

“Evaluación de la virulencia, respuesta inflamatoria y mortalidad de cepas de Pseudomonas aeruginosa con distintos grados de resistencia antimicrobiana mediante un modelo de peritonitis-sepsis en ratón”

2. La Comissió d'Experimentació Animal, en la reunió feta el **24.10.2013** va informar **Favorablement** la realització d'aquest procediment d'experimentació.

Així mateix, la CEA acorda:

- que s'ha de comunicar al centre que han de modificar els criteris de punt final de manera que la situació d'animal amb automutilacions sigui considerada criteri de punt final, independentment de la puntuació total assolida. Així mateix cal revisar la màxima puntuació possible del protocol de supervisió ja que segons l'indicat seria de 12 enlloc de 16.

Fonaments de dret

1. El Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques, estableix que per a la realització de procediments d'experimentació que es troben inclosos en algun dels supòsits establerts al seu article 34, es requereix autorització expressa.
2. L'article 36 de l'esmentat Decret estableix que la Comissió d'Experimentació Animal emetrà un informe sobre la realització dels procediments que requereixen autorització expressa, que tindrà caràcter vinculant.

REGISTRE	
CEEA.	
Comitè d'Experimentació Animal	
Data:	07 NOV. 2013
Entrada:	331/13
Sortida:	

3. D'acord amb la llei 30/1992, de règim jurídic de les administracions públiques i del procediment administratiu comú, emeto la present

Resolució

Per tant, resolc:

1. Informar **Favorablement** la sol·licitud d'autorització expressa del procediment d'experimentació que es relaciona a continuació, al mateix temps que se'ls notifica la informació i/o l'aplicació de les mesures correctores abans exposades:

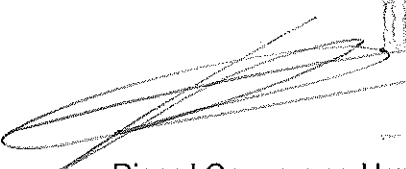
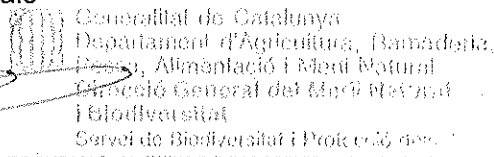
Títol: "Evaluación de la virulencia, respuesta inflamatoria y mortalidad de cepas de Pseudomonas aeruginosa con distintos grados de resistencia antimicrobiana mediante un modelo de peritonitis-sepsis en ratón"

Núm. ordre DAAM: **7312**

2. S' autoritza la realització d'aquest procediment d'experimentació fins la data:
30.10.2015

Contra aquesta resolució que no exhaurix la via administrativa, es pot interposar recurs d'alçada davant el director general del Medi Natural i Biodiversitat en el termini d'un mes, a comptar de l'endemà de la notificació d'aquesta resolució, segons el que estableix l'article 114 de la Llei 30/1992, de 26 de novembre, de règim jurídic de les administracions públiques i del procediment administratiu comú.

El cap del Servei de Biodiversitat i
Protecció dels Animals



Generalitat de Catalunya
Departament d'Agricultura, Ramaderia,
Pesca, Alimentació i Medi Natural
Direcció General del Medi Natural
i Biodiversitat
Servei de Biodiversitat i Protecció dels Animals

Ricard Casanovas Urgell

Barcelona, 30 d'octubre de 2013



Generalitat de Catalunya
Departament d'Agricultura, Ramaderia,
Pesca, Alimentació i Medi Natural
Direcció General del Medi Natural i Biodiversitat

Ignasi Rodríguez Galindo
Subdirector general de la Biodiversitat

CERTIFICO

Que el/la Sr/a

SILVIA GÓMEZ-ZORRILLA MARTÍN

Amb DNI/ NIE/ Passaport

50880457H

ha acreditat davant del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural reunir els requisits necessaris per exercir les tasques de **personal investigador** d'acord amb el que estableix el Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

I perquè així consti, signo el present certificat.

Barcelona, 12 de març de 2013

Generalitat de Catalunya
Departament d'Agricultura, Ramaderia,
Pesca, Alimentació i Medi Natural
**Direcció General del Medi Natural
i Biodiversitat**
Servei de Biodiversitat i Protecció dels Animals



Curs de Formació de Personal Investigador Usuari d'Animals d'Experimentació



M^a. Teresa Rodrigo Calduch, Coordinadora del Curs de Formació de Personal Investigador Usuari d'Animals d'Experimentació,

CERTIFICO:

Que **Silvia GÓMEZ-ZORRILLA MARTÍN**, amb DNI/NIE número 50880457H, ha superat amb la qualificació **EXCEL·LENT** el **Curs de Formació de Personal Investigador Usuari d'Animals d'Experimentació**, que va tenir lloc els dies Del 26 de novembre al 18 de diciembre de 2012 (Fac. Medicina) a la Universitat de Barcelona, i que està a l'espera de l'acreditació emesa pel Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya

Barcelona, a 31 de gener de 2013.