

# **Epidemiología de la infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* en la Fibrosis Quística**

FÉLIX M<sup>a</sup> BARANDA GARCÍA

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**TESIS DOCTORAL - 2017**



# **Epidemiología de la infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* en la Fibrosis Quística**

FÉLIX M<sup>a</sup> BARANDA GARCÍA

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**TESIS DOCTORAL - 2017**



## AGRADECIMIENTOS

---

Para la elaboración de este estudio, he contado con la colaboración entusiasta y desinteresada de un grupo de personas, compañeros y amigos a los que quiero expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, a los pacientes con Fibrosis Quística y a sus familias por otorgar su consentimiento para ser incluidos en este estudio. Vosotros sois los verdaderos protagonistas de este trabajo. Gracias por vuestra colaboración.

A mis directores de tesis, el Dr. Ramón Cisterna Cáncer y el Dr. Batxi Galdiz Iturri por depositar su confianza en mí, por su apoyo constante y sus consejos.

Gracias a todos los miembros de la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario de Cruces, pues ellos también han sido partícipes de este estudio. A mis compañeras Ainhoa Gómez y Beatriz Gómez. A Itziar Llaguno y Yolanda Fraga nuestras enfermeras coordinadoras, y al Dr. Carlos Vázquez por sus enseñanzas sobre la Fibrosis Quística y por su amistad.

Gracias a todos mis compañeros del Servicio de Neumología. Gracias a la Dra. Amaia Urrutia por transformar un montón de datos recogidos en papel en una base de datos. Gracias a la Dra. Marta Intxausti por su labor como traductora. Mi agradecimiento especial al profesor Batxi Galdiz por su apoyo entusiasta durante la elaboración de esta tesis.

Gracias a los miembros de la Unidad de Epidemiología y Apoyo a la Investigación. A su secretaria, Amaya Martínez-Galarza por su amabilidad y apoyo constante, a Maite Solís por su gran trabajo y, muy especialmente al Dr. José Ignacio Pijoan por dar respuesta a los múltiples interrogantes que le he planteado durante la elaboración de esta tesis. Gracias por tu excelente y riguroso trabajo.

Mi agradecimiento al equipo humano del Servicio de Microbiología por permitirme y facilitarme los datos microbiológicos que se recogen en este estudio. Gracias a la Dra. Mercedes Sota, a la Dra. Leyre Mónica López-Soria por trasmitirme su entusiasmo, al Dr. Mikel Gallego y, de forma especial a mi compañera y amiga la Dra. Elena Urra por su ayuda constante y sus consejos en todo lo referente a la microbiología de la Fibrosis Quística.

Gracias al Dr. Neils Hoiby del Departamento de Microbiología Clínica y Centro de Fibrosis Quística Danés. Rigshospitalet, University of Copenhagen, por su colaboración desinteresada en la determinación de las precipitinas séricas de los pacientes con FQ de nuestra unidad desde hace más de tres décadas.

Gracias a mi compañero José Luis García Ledesma de la Unidad de Comunicación Médica de Osakidetza, por su inestimable ayuda en la presentación gráfica de esta tesis.

Gracias a mis amigos, el Dr. José Luis Cañada y el Dr. Mikel Longa, por ayudarme en los primeros pasos del presente estudio.

Gracias a mi familia.

## DEDICATORIA

---

*A las personas con fibrosis quística.*



# ÍNDICE

Resumen	1
Summary	3
Laburpena	5

## I. INTRODUCCIÓN

---

1. Fibrosis Quística (FQ)	7
1.1- FQ. Regulador de la conductancia transmembrana (CFTR)	8
1.1.1 Gen CFTR	9
1.1.2 Estructura proteína CFTR	9
1.1.3 Función proteína CFTR	10
1.1.4 Clases de mutaciones del gen CFTR	11
1.2- Manifestaciones clínicas de la FQ	12
1.3- Diagnóstico de la FQ	14
2. Patogenia de la Enfermedad Pulmonar en la FQ	16
2.1 Las defensas normales del pulmón	16
2.1.1 Aclaramiento mecánico	16
2.1.2 Los mediadores antimicrobianos	17
2.1.3 Sistema inmune innato	18
2.2 Patogenia de la enfermedad pulmonar en la FQ	18

3. Microbiología de los pulmones en la FQ	22
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.2 <i>Haemophilus influenzae</i>	25
3.3 <i>Burkholderia cepacia</i> complex (BCC)	26
3.3.1 Síndrome cepacia	28
3.3.2 Resistencia farmacológica BCC	28
3.3.3 Transmisión BCC en pacientes FQ	28
3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3.4.1 Microbiología general	31
3.4.2 Sistema Quórum Sensing	32
3.4.3 La formación de biopelículas	33
3.4.4 Adquisición de <i>P. aeruginosa</i> en la FQ	36
3.4.5 La infección intermitente por <i>P. aeruginosa</i>	37
3.4.6 La infección crónica <i>P. aeruginosa</i>	37
3.4.7 Conversión de <i>P. aeruginosa</i> en fenotipo mucoide	38
3.4.8 Anticuerpos séricos frente a <i>P. aeruginosa</i> . Precipitinas	39
3.4.8.1 Antecedentes	39
3.4.8.2 Métodos diagnósticos	40

4. Resistencia Antibiótica	43
4.1 Mecanismos de Resistencia Antibiótica	43
4.2 Multirresistencia Antibiótica	47
4.3 Mecanismos de Resistencia de <i>P. aeruginosa</i>	49
4.3.1 Resistencia intrínseca	50
4.3.2 Resistencia adquirida	50
4.3.3 Mecanismos de resistencia de <i>P. aeruginosa</i> en la FQ	51
4.4 Factores asociados a la adquisición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52

## **II. HIPÓTESIS**

---

## **III. OBJETIVOS**

---

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

---

1. Población de estudio	59
2. Datos demográficos, clínicos y microbiológicos de los pacientes	59
2.1 Datos demográficos y clínicos	59
2.2 Datos Microbiológicos	60
3. Cultivo microbiológico e identificación de los aislados	61
4. Estudios de sensibilidad antibiótica	62
4.1. Método de microdilución en caldo	63
4.2 Método disco-placa	63
4.3 Método del Épsilon test (E-test)	64
4.4 Definición de resistencia y multirresistencia en <i>P. aeruginosa</i>	64
5. Determinación de precipitinas frente a <i>P. aeruginosa</i>	65
5.1 Sujetos y diseño del estudio	65
5.2 La inmunoelectroforesis cruzada	66
6. Análisis estadístico	67

## V. RESULTADOS

---

1. Características de la población estudiada	69
2. Patrones de colonización/infección	71
2.1 Patrones de colonización múltiple	77
2.2 Patrones de colonización múltiple en pacientes con <i>P. aeruginosa</i>	78
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en nuestra población con FQ	80
3.1 Prevalencia de <i>P. aeruginosa</i> periodo 1996-2014	80
3.2 Características de la colonización/infección por <i>P. aeruginosa</i>	81
3.3 Cronología de la infección pulmonar por <i>P. aeruginosa</i>	83
3.4 Morfotipos de los aislados de <i>P. aeruginosa</i>	84
3.5 Patrón de resistencia antibiótica de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	86
3.5.1 Patrón de resistencia antibiótica periodo 1996-2014	86
3.5.2 Patrón de resistencia antibiótica cepas <i>P. aeruginosa</i> 2014	87
3.6 Factores asociados a la infección crónica por <i>P. aeruginosa</i>	89
4. Repercusión clínica de la infección pulmonar por <i>P. aeruginosa</i>	94
4.1 Impacto sobre la función pulmonar	94
4.2 Impacto sobre la función pulmonar según estado de colonización	95
4.3 Impacto clínico número de exacerbaciones e ingresos hospitalarios	97

5. Precipitinas séricas en nuestra población con FQ	99
5.1 Nivel de precipitinas en nuestra población (año 2014)	99
5.2 Precipitinas vs estado de colonización por <i>P. aeruginosa</i> (1996-2014)	100
5.3 Correlación precipitinas vs estado nutricional (IMC)	101
5.4 Correlación precipitinas vs función pulmonar	101
5.5 Correlación precipitinas vs alteraciones en la TAC. “Score de Bhalla”	103
5.6 Valor precipitinas para predecir evento de trasplante/Exitus	104
5.7 Evolución nivel precipitinas hasta el evento del trasplante/Exitus	106

## VI. DISCUSIÓN

---

1. Prevalencia de <i>P. aeruginosa</i> en nuestros pacientes FQ	109
2. Cronología de la infección por <i>P. aeruginosa</i> y sus morfotipos	111
3. Perfil de resistencia antibiótica de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	116
4. Factores asociados con la colonización/infección por <i>P. aeruginosa</i>	120
5. impacto clínico de la colonización/infección por <i>P. aeruginosa</i>	126
6. Precipitinas séricas frente a <i>P. aeruginosa</i>	130
7. Implicaciones clínicas	134

## VII. CONCLUSIONES

137

---

Abreviaturas

139

Patrón de colores

145

Bibliografía

147



## RESUMEN

---

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva que más frecuentemente amenaza la vida en las personas de raza blanca. Esta causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana (CFTR) de la fibrosis quística, que conduce a un transporte perturbado de iones a través de las células epiteliales. Las consecuencias clínicas de este defecto genético se ven en las glándulas exocrinas, causando insuficiencia pancreática y la insuficiencia pulmonar progresiva que es la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con FQ. El epitelio de la vía aérea es susceptible a la colonización microbiana que implica la infección y la inflamación, incluso en pacientes con enfermedad pulmonar clínicamente leve (1). El patógeno respiratorio más frecuente es *Pseudomonas aeruginosa* (2), que se cultiva en las muestras respiratorias de hasta un 21% de los niños con FQ menores de 1 año de edad y, en ausencia de una política de tratamiento de erradicación precoz, aumenta hasta el 80% a los 26 años de edad.

Su presencia se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad, sobre todo cuando se desarrollan las formas mucoides (3). La erradicación de *P. aeruginosa* por lo general no es posible en el caso de la infección crónica, pero la terapia precoz de antibióticos ha demostrado eliminar con éxito *P. aeruginosa* del tracto respiratorio de los pacientes con FQ (4). Actualmente, se recomienda una política de erradicación temprana (5) y ha sido implementada en la mayoría de los centros de FQ. A pesar de esta aceptación general del principio de un tratamiento de erradicación precoz, no está claro cuál es el régimen terapéutico que proporciona el mejor efecto y cuáles son los factores individuales de los pacientes que podrían estar asociados con un mayor o menor éxito erradicador.

Con estos antecedentes nos planteamos la hipótesis de que una identificación y conocimiento en profundidad de estos factores pronósticos, podría ayudar a llevar a cabo un tratamiento de erradicación de una forma más específica y selectiva.

Los estudios presentados en esta tesis investigaron la prevalencia global de la infección crónica por *P. aeruginosa* en nuestra cohorte de pacientes con FQ, y dentro de ésta la de las cepas multirresistentes a los antibióticos antipseudomónicos. Nuestros resultados muestran una tasa de colonización/infección crónica por *P. aeruginosa* en nuestra cohorte del 45,4% globalmente, pero que alcanza cifras del 58,5% en los pacientes adultos mayores de 18 años.

El análisis de los factores asociados al desarrollo de la infección crónica por *P. aeruginosa*, mostró como factores con significación estadística, el ser portador de una genética en homocigosis para la mutación F508del, el aumento del nivel de precipitinas séricas y la coinfección por el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*.

Las tasas de resistencia a los antibióticos antipseudomónicos en el grupo de pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa*, eran superiores al 50% en la práctica totalidad de las familias de antibióticos. La colistina fue el antibiótico con una tasa menor de resistencia. Los pacientes con *P. aeruginosa* multirresistente presentaban un peor curso clínico, con un aumento en el número de exacerbaciones infecciosas y de ingresos hospitalarios. Los niveles de precipitinas, determinados anualmente mediante electroforesis cruzada, nos permitieron discriminar en nuestros pacientes FQ la existencia de una colonización intermitente por *P. aeruginosa* versus infección crónica.

Un hallazgo novedoso y, a nuestro entender relevante, fue la constatación de que un nivel elevado de precipitinas séricas frente a *P. aeruginosa*  $\geq 10$  unidades unido a un rápido incremento anual en los dos últimos años, representa un dato analítico de mal pronóstico, relacionado con la mortalidad o la necesidad de un trasplante pulmonar.

## SUMMARY

---

Cystic fibrosis (CF) is the commonest life-threatening hereditary disease in people of European ancestry. Patients inherit from each of their parents a disease-causing mutation in their Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR), which encodes a cAMP-dependent chloride channel in the surface of epithelial cells, leading to disturbed ion transport across their apical membrane, ultimately causing exocrine pancreatic insufficiency, and progressive chronic airways disease. The airways of the patients, develop very early chronic obstructive changes, as well as polymorphonuclear dominated neutrophilic inflammation, and are susceptible to early colonization and chronic infection with specific bacterial pathogens, which in turn enhances airways inflammation, even in patients with apparently mild clinical disease (1). *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is the organism most frequently isolated in respiratory samples (2), being recovered from 21% of CF children younger than 1, and from up to 80% in patients aged 26 or older, unless early eradication therapy strategies are used.

Chronic airways infection with *P. aeruginosa*, especially the mucoid type, is associated with increased morbidity and mortality (3). While eradication of *P. aeruginosa* is not possible once chronic infection is established, early treatment after bronchial colonization can be successful (4). Early eradication therapy is now strongly recommended (5) and it is regularly used across most CF centers. While a number of different approaches have been used, there still remain uncertainties both about the optimal strategy and the patients-related factors associated to eradication failure.

We hypothesized that identification and in-depth knowledge of these prognostic factors, could be paramount for the development of more specific and selective eradication strategies.

In this PD. thesis we investigated the prevalence of chronic bronchial infection with *P. aeruginosa* in our cohort of patients with cystic fibrosis, and *P. aeruginosa* strains which had become multiresistant to anti-*Pseudomonas* antibiotics. We found an overall 45.4% prevalence of bronchial colonization-infection in our cohort rising up to 58.5% in those older than 18 years.

Being homozygous for the mutation F508del, having an increased number of serum precipitins to *P. aeruginosa* and coinfection with the filamentous fungal organism *Aspergillus fumigatus* were all found to be significant risk factors for developing chronic bronchial infection with *P. aeruginosa*.

Resistance to anti-*Pseudomonas* antibiotics classes exceeded 50% on average in patients with chronic bronchial infection. Colistin had the lowest resistance rate. Patients with chronic airways infection with multidrug-resistant *P. aeruginosa* had a poorer clinical course, with an increased number of clinical exacerbations and hospital admissions. The study of the number of serum precipitins to *P. aeruginosa*, which is determined annually by crossed immune electrophoresis in our patients, enabled us to differentiate patients with intermittent infection from those with chronic infection.

A novel, relevant - in our opinion - finding, was the observation that a number of serum precipitins to *P. aeruginosa* higher than 10 together with a fast increase over the two previous years is a poor prognosis indicator, and it is associated with increased mortality risk and need for a pulmonary transplantation.

## LABURPENA

---

Fibrosi Kistikoa (FK) arraza zuriko pertsonen bizitza arriskuan gehien jartzen duen gaixotasun autosomiko errezesiboa da. Mintzarteko koduktantzia erregulatzen duen genearen (CFTR) mutazioengatik dago eraginda, honek ioi garraio asaldatu bat sortarazten du zelula epitelialetan zehar. Akats genetiko honen ondorio klinikoak glandula exokrinoetan ikusten dira, gutxiegitasun pankreatikoa eta birika gutxiegitasun progresiboa eraginez, zein morbi-mortalitate arrazoi nagusia den FK gaixoen artean. Arnas bideko epitelioak mikrobio kolonizazioarekiko joera izan dezake infekzio eta inflamazioa eraginez, baita birika gaixotasun arina duten gaixoen artean ere (1). Arnas patogenorik sarriena *Pseudomonas aeruginosa* da (2), hau urte 1 baino gazteago diren FK -dun umeen arnas laginen %21 -ean haztera iristi daiteke, eta tratamendu erradikatzailerik goiztiar baten ezean, 26 urterekin %80 -raino igo daiteke.

Bere presentzia morbilidade eta mortalitate handiago batekin lotzen da, batez ere forma mukoideak garatzen direnean (3). *P. aeruginosa*-ren erradikazioa normalean ezinezkoa izaten da infekzio kronikoa garatzen den kasuan, baina antibiotiko terapia goiztiarrak *P. aeruginosaren* ezabapen arrakatatsua frogatu du FK-dun gaixoen arnas bideetan (4). Gaur egun, erradikazio politika goiztiar bat gomentatzen da (5) eta FK zentru gehienetan ezarri da. Tratamendu erradikatzailerik goiztiar honek onarpen orokorra izan arren, ez dago argi zein den emaitzarik hoberenak eskeintzen dituen erregimen terapeutikoa, ezta zeintzuk diren erradikazio arrakastatsu baterako gaixoaren banako faktoreak.

Aurrekari hauekin, faktore pronostiko hauen identifikazio eta ezagutzak, tratamendu erradikatzailerik espezifikoa eta selektiboagoak garatzera eraman ziezaguketelaren hipotesia planteatu genuen.

Ikerketa tesi hontan aurkezten diren lanek, *P. aeruginosa*-rengatiko infekzio kronikoaren prebalentzi globala aztertu zuten gure FK-dun gaixo kohortean, eta hauen artean antibiotiko antipseudomonikoekiko zepa multiresistenteena. Gure emaitzen arabera, gure kohortean *P. aeruginosa*-rengatiko kolonizazio/infekzio kronikoaren tasa %45,4-koa da globalki, %58,5-ra iritsiz 18 urte baino gehiagoko helduetan.

*P. aeruginosa*-gatiko infekzio kronikoa garatzearekin loturiko faktoreen analisiak esangura estatistikoarekin azaldu zituen: F508del mutazioaren eramaile izatea homozigotian, prezipitina serikoen maila handituak izatea eta *Aspergillus fumigatus* onddo harizpituarengatiko koinfekzioa jasatea.

Antibiotiko antipseudomonikoekiko erresistentzi tasak *P. aeruginosa*-gatiko infekzio kronikodunen artean, %50 baino altuago izan ziren ia antibiotiko famili guztietan. Kolistina izan zen erresistentzi tasarik baxuena izan buen antibiotikoa. *P. aeruginosa* multiresistentea zuten gaixoei eboluzio kliniko okerragoa aurkezten zuten, infekzio areagotze eta hospitalizazio gehiagorekin. Prezipitina mailek, elektroforesi gurutzatu bidez urtero neurtuta, aldizkako *P. aeruginosa* kolonizazioak eta infekzio kronikoak diskriminatzen lagundu ziguten gure FK gaixoetan.

Aurkikuntza berri bat, eta gure ustez esanguratsua, honakoa izan zen: *P. aeruginosa* aurkako prezipitina seriko maila altuak (10 unitatetik gora), urtean zeharkako igoera azkar batekin lotuta aztertu bi urtetan; pronostiko txarreko datu analitiko bat adierazten dute, mortalitatearekin edo eta birikia trasplante baten behararekin lotuta.

# I. INTRODUCCIÓN

---

## 1. Fibrosis quística

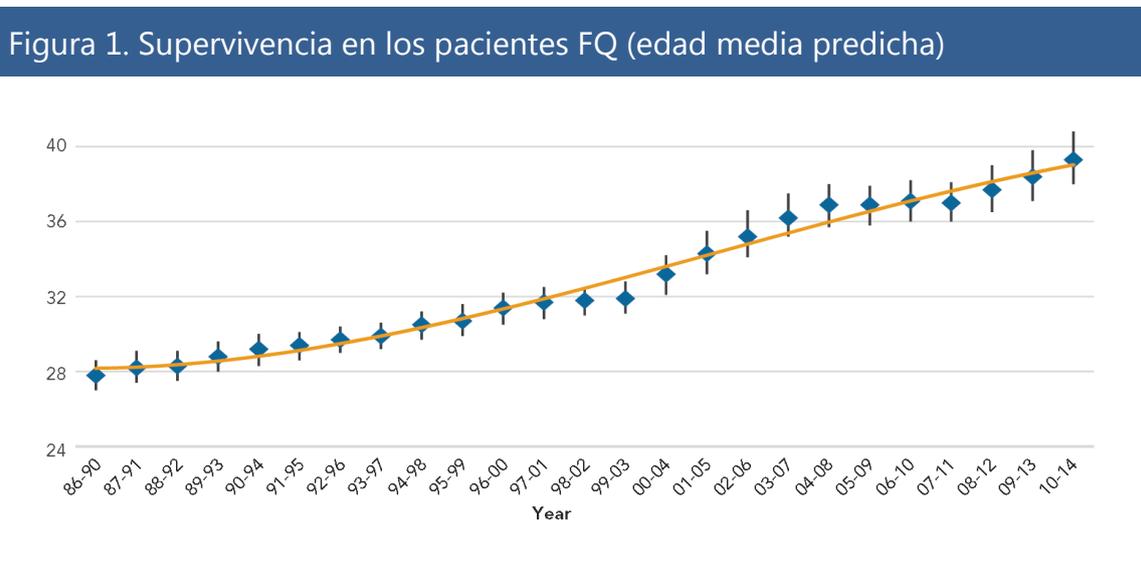
La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad multisistémica que afecta al sistema digestivo, las glándulas sudoríparas, vías respiratorias superiores e inferiores, y el tracto reproductivo, pero la enfermedad pulmonar progresiva sigue siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad (6).

La FQ se caracteriza por el transporte anormal de cloruro y de sodio a través del epitelio respiratorio, resultando en unas secreciones de las vías respiratorias viscosas (7). A lo largo de un periodo de tiempo muy variable que puede ir desde meses hasta décadas después del nacimiento, los individuos eventualmente desarrollan una infección crónica de las vías respiratorias con un patrón característico de la flora bacteriana (8), lo que lleva a la insuficiencia respiratoria progresiva. La tasa de progresión varía mucho, dependiendo en parte del genotipo, así como de factores ambientales. Los datos del Registro de los Centros FQ en los Estados Unidos y Europa indican una supervivencia media de alrededor de 40 años (9). Las mujeres con FQ parecen tener una mayor morbilidad y mortalidad que los hombres (10). Esta "brecha de género" es modesta pero consistente a través de muchas poblaciones y se ha planteado la hipótesis de que se deba a los efectos proinflamatorios de los estrógenos.

Antes de 1938, la FQ no fue reconocida como una sola enfermedad, sino como una colección de diversos síndromes. Las primeras descripciones de la FQ fueron principalmente sobre defectos del sistema digestivo, como íleo meconial, dificultad en la alimentación y la falta de aumento de peso. Los niños nacidos con FQ morían casi uniformemente en su primer año de vida.

En 1938, Anderson publicó un estudio detallado que describe la similitud de las características patológicas entre un grupo de niños pequeños que murieron a causa de una obstrucción intestinal o por complicaciones respiratorias (11). Fue la primera observación que llevó a una comprensión de la FQ como una sola enfermedad con diversos efectos. Anderson también propuso que la FQ era una enfermedad

hereditaria, pero no fue hasta 1989 que se descubrió el gen responsable de la FQ (12). Desde entonces, se han identificado más de 1.800 mutaciones en el gen CFTR, como responsable de una amplia gama en la gravedad clínica de la FQ, y se han producido avances sustanciales en la investigación básica y clínica que han contribuido a nuevas pruebas de diagnóstico y nuevos tratamientos. Actualmente, la edad mediana de supervivencia de las personas con FQ supera los 40 años (9) (Figura 1). En el futuro, los nuevos acontecimientos relacionados con la terapia génica y tratamientos dirigidos a solucionar el defecto básico de la FQ se espera que consigan una mayor esperanza de vida y una mejor calidad de vida.



Tomado de: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report 2014.

### 1.1 Regulador de la conductancia transmembrana (CFTR)

En el año 1989 terminó un largo trabajo de investigación con la publicación en la revista *Science* de la identificación del gen que produce la FQ (13). En el mismo número de la revista se describe el clonaje de la molécula de ARNm del gen y la estructura de la proteína a la que daría lugar.

### **1.1.1 Gen CFTR**

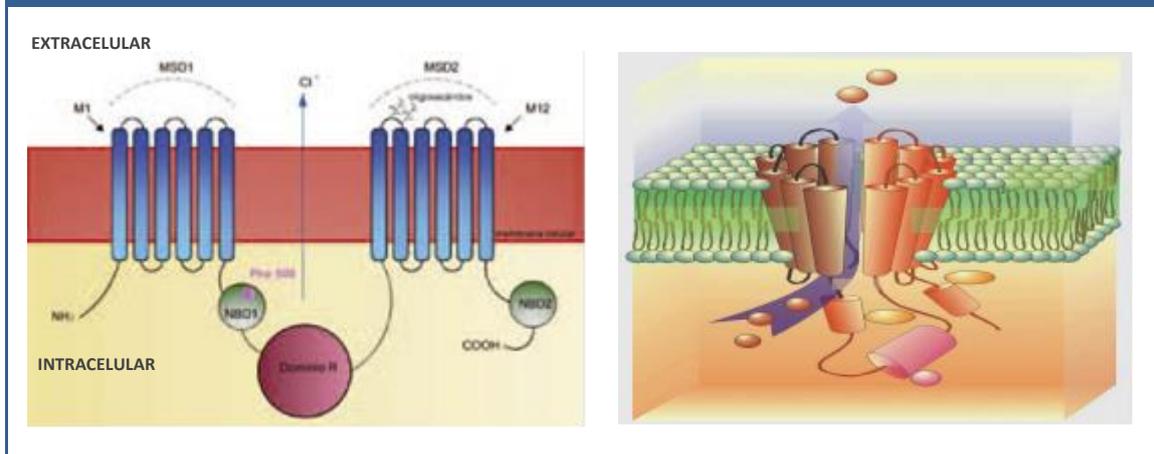
El gen CFTR se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 (14). Está compuesto por 250.000 pares de bases de longitud y codifica una proteína de 1.480 aminoácidos, la proteína CFTR. La mutación más común, F508del, es una delección de tres nucleótidos que se traduce en una pérdida del aminoácido fenilalanina en la posición 508a en la proteína y crea una proteína que normalmente no se pliega. Esta proteína defectuosa no se transfiere a la red de Golgi, un requisito para la expresión en la membrana, sino que es retenida en el retículo endoplasmático y finalmente se degrada intracelularmente (15).

### **1.1.2 Estructura de la proteína CFTR**

La CFTR es una proteína de 170.000 dalton anclada a la membrana por dos dominios transmembrana; cada dominio transmembrana atraviesa 6 veces la doble capa lipídica (Figura 2). Tiene dos sitios de unión al ATP, Nucleotide Binding Domain 1 y 2 (NBD1 y 2) y un dominio regulador (dominio R) de alto contenido en aminoácidos eléctricamente cargados como glutámico, aspártico, glutamina y lisina. Los sitios de unión al ATP presentan una gran similitud con dominios similares de una superfamilia de proteínas llamadas proteínas ABC, entre las que se encuentran las proteínas de resistencia a fármacos (MDR) del ratón y de los humanos, el transportador del factor sexual del *Saccharomyces cerevisiae* (STE6) y el factor de resistencia a cadmio (YCF1) de las levaduras.

Figura 2. Esquema de la proteína CFTR

Modelo molecular del canal CFTR



Tomado de: Mornon y cols. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 3469–3486.

Esquema de la proteína CFTR. Dominios transmembrana MSD1 y MSD2; sitios de unión al ATP (Nucleotide Binding Domain) NBD 1 y NBD 2; dominio R. F508 indica en el NBD1 el sitio de la mutación más frecuente en fibrosis quística, deleción de la fenilalanina 508 (F508del).

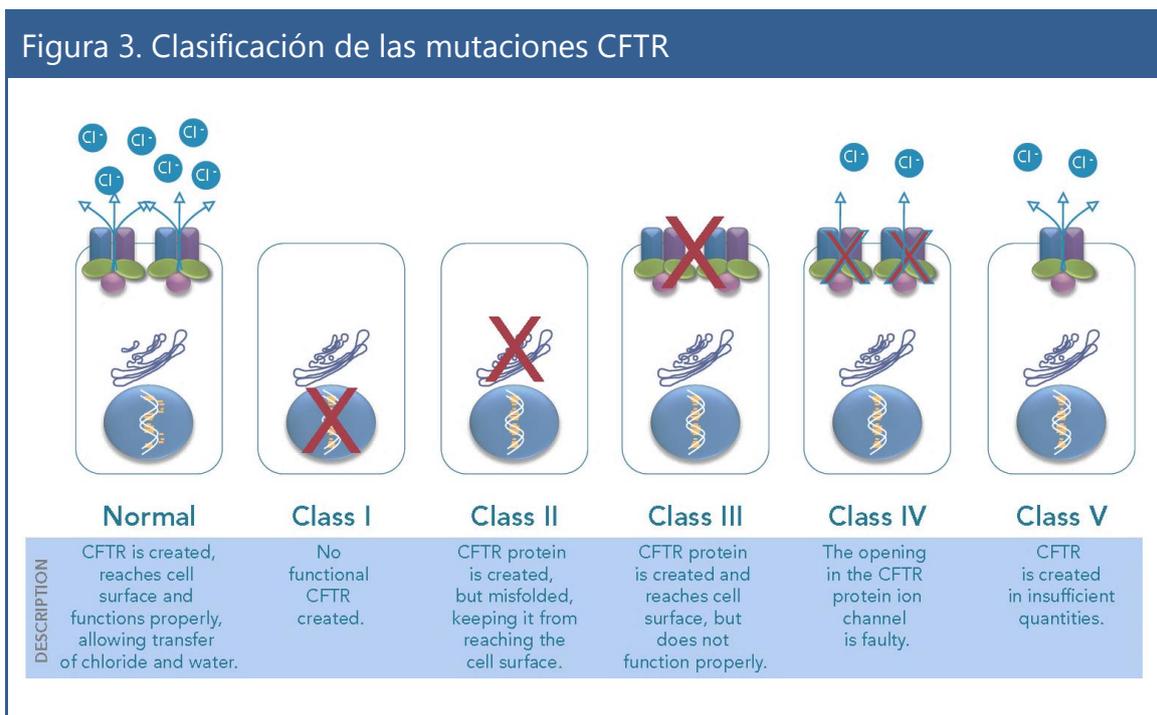
### 1.1.3 Función de la proteína CFTR

La función biológica de la CFTR fue aclarada por la observación de que el sudor de individuos con FQ contiene niveles anormalmente altos de electrolitos. Normalmente, las glándulas sudoríparas liberan la secreción isotónica y mientras esta secreción viaja a la superficie de la piel las proteínas CFTR, situadas dentro de las membranas plasmáticas de las células epiteliales que recubren los conductos, actúan para reabsorber cloruro de sodio. Los conductos del sudor de las personas FQ sin embargo son impermeables al cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), lo que resulta en el aumento de las cargas negativas lumbales y la disminución del flujo de sodio ( $\text{Na}^+$ ). Así, el  $\text{ClNa}$  sigue siendo anormalmente alto en la secreción. Esta observación revela el papel fundamental de la proteína CFTR como un canal de iones  $\text{Cl}^-$  (16).

### 1.1.4 Clases de mutaciones del gen CFTR

Actualmente la base de datos de las mutaciones en la Fibrosis Quística enumera más de 1.800 mutaciones diferentes en el gen CFTR con potencial para causar la enfermedad ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/)).

Las mutaciones asociadas a la enfermedad FQ pueden clasificarse en cinco clases (Figura3). La mutación más frecuente, la F508del, se clasifica como un defecto de clase II. La proteína CFTR se expresa con especificidad tisular; se ha demostrado que CFTR reside en la membrana apical de las células epiteliales exocrinas, incluyendo la glándula sudorípara, conductos pancreáticos, conductos biliares, intestino, conductos genitales masculinos y el tracto respiratorio (17). La mutación del CFTR afecta por lo tanto a esos órganos.



Tomado de: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report 2014.

Clases de mutaciones del CFTR: Las mutaciones de clase I producen como resultado la ausencia de síntesis de proteínas CFTR funcionantes, las mutaciones de clase II producen como resultado proteínas CFTR que no se pliegan adecuadamente y son

degradadas, las mutaciones de clase III producen como resultado proteínas CFTR que tienen un defecto en la regulación del canal, las mutaciones de clase IV producen como resultado canales CFTR que presentan propiedades de conducción defectuosas y las mutaciones de clase V producen como resultado cantidades residuales de proteína CFTR funcional.

## **1.2 Manifestaciones clínicas de la FQ**

Los síntomas de la FQ difieren de una persona a otra dependiendo de la gravedad de la enfermedad. En general, la patología básica de la FQ se debe a la función anómala del CFTR, provocando alteraciones electroquímicas que conducen a la deshidratación y la formación de moco espeso que taponan los conductos de las glándulas exocrinas.

Los síntomas suelen aparecer dentro del primer año después del nacimiento. La piel con sabor salado, que es causada por una homeostasis anormal de las glándulas sudoríparas y es una característica común de las personas con FQ, condujo al desarrollo de la prueba del sudor. Desarrollada por primera vez en 1953 (18), la prueba del sudor, que mide la cantidad de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el sudor, sigue siendo el método estándar de oro para el diagnóstico de la FQ.

En el pasado, la mayoría de los pacientes fueron diagnosticados de FQ después de presentar los síntomas. Debido a la expansión de los programas de cribado neonatal durante la última década, ha habido un aumento dramático en el número de casos de FQ identificados antes de presentar los síntomas. En 2001, menos del 10 por ciento de los casos de FQ fueron diagnosticados sobre la base de programas de cribado neonatal (9); en el año 2014, el 63% fueron diagnosticados por cribado neonatal. Antes de la puesta en práctica del cribado neonatal, los bebés y los niños fueron diagnosticados de FQ típicamente después de presentar uno o más de los siguientes síntomas (19): síntomas respiratorios (45% de los pacientes), retraso en el desarrollo pondo-estatural (28%) o íleo meconial (20%).

Los pacientes que presentan un diagnóstico tardío de FQ en la edad adulta, son más propensos a tener síntomas atípicos. Un gran estudio de cohortes retrospectivo de más de 1000 pacientes con FQ encontró que el 7% fueron diagnosticados con una edad  $\geq 18$  años (20). Los pacientes diagnosticados en la edad adulta eran más propensos que los niños a presentar síntomas gastrointestinales, diabetes mellitus e infertilidad. Además, los adultos que presentan FQ eran más propensos a tener mutaciones genéticas poco comunes, una función normal de páncreas, y resultados en las pruebas de cloruro en el sudor no concluyentes ( $<60$  mmol/L).

La afectación de la vía respiratoria típicas de la FQ incluyen una tos productiva persistente, la hiperinsuflación de los campos pulmonares en la radiografía de tórax y pruebas de función pulmonar que son consistentes con enfermedad obstructiva de las vías respiratorias. La aparición de los síntomas clínicos varía ampliamente, debido a diferencias en el genotipo CFTR y otros factores individuales, pero las anomalías de la función pulmonar a menudo son detectables incluso en ausencia de síntomas.

Una infección transitoria de la vía aérea con bacterias patógenas a menudo ocurre a edades muy tempranas de la vida. Con el tiempo, durante años y con una variación importante entre los individuos, se establece una infección crónica de las vías respiratorias con *Staphylococcus aureus* y otras bacterias gram negativas, a menudo con pruebas radiográficas de bronquiectasias. *S. aureus* y *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT) son patógenos comunes durante la primera infancia, pero en última instancia, *Pseudomonas aeruginosa* se aíslan de las secreciones respiratorias de la mayoría de los pacientes. Otros microorganismos que parecen colonizar e infectar con más frecuencia a estos pacientes incluyen *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, complejo *Burkholderia cepacia*, micobacterias no tuberculosas (especialmente *M. avium* y *M. abscessus*), y el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*. Esta predisposición a la infección por *Pseudomonas aeruginosa* parece ser debida a una alteración en el epitelio respiratorio inducida directamente por un CFTR defectuoso.

Mientras que las personas con FQ experimentan una amplia gama de síntomas, el problema de salud con más impacto sobre la morbilidad y la mortalidad es la infección pulmonar crónica. La insuficiencia respiratoria producida por la infección bacteriana crónica es la causa principal de la muerte en la FQ, y *P. aeruginosa*, es la bacteria causal más frecuente (21). A pesar de que los estudios acumulados proporcionan una gran comprensión de los mecanismos genéticos y moleculares que conducen a la FQ, el enlace entre las propiedades fisiológicas de los pulmones con FQ y la infección crónica sigue sin aclararse.

### 1.3 Diagnóstico de la FQ

El diagnóstico de la fibrosis quística se basa en los hallazgos clínicos compatibles con la confirmación bioquímica o genética (22). La prueba de cloruro en el sudor es el pilar de la confirmación de laboratorio, aunque las pruebas de mutaciones específicas, diferencia de potencial nasal, tripsinógeno inmunorreactivo, grasa en heces fecales, o la secreción de enzimas pancreáticas también pueden ser útiles en algunos casos.

Criterios diagnósticos. Deben cumplirse de forma conjunta los siguientes criterios para diagnosticar la fibrosis quística (23):

- Síntomas clínicos consistentes con FQ en al menos un sistema de órganos diana.
- Evidencia de disfunción del CFTR (cualquiera de los siguientes):
  - Test de cloruro en sudor positivo  $\geq 60$  mmol / L (en dos ocasiones)
  - Presencia de dos mutaciones causantes de enfermedad en el gen CFTR, en cada uno de los alelos paternos.
  - Hallazgo de diferencia de potencial nasal anómalo.

No se requiere el criterio de los síntomas clínicos para los recién nacidos identificados a través de un programa de cribado o para los hermanos de los pacientes con FQ que son diagnosticados por el genotipo compartido (Tabla 1).

La evidencia de disfunción del CFTR puede ser proporcionada por la prueba de cloruro en sudor, el análisis molecular para las mutaciones CFTR, o mediciones de diferencia de potencial nasal. En la mayoría de los casos, la determinación de cloruro en el sudor es la primera prueba y la más importante. Las pruebas de ADN se utiliza para la confirmación o para una mayor investigación de los pacientes con resultados intermedios de cloruro en sudor y con fines pronósticos y epidemiológicos en los individuos con resultados positivos de la prueba de cloruro en el sudor.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la FQ

<b>Una o más características fenotípicas típicas de la FQ:</b>
Enfermedad sinopulmonar crónica
Anomalías características gastrointestinales y nutricionales
Síndromes de pérdida de sal
Azoospermia obstructiva
<b>o</b>
Un historial de fibrosis quística en un hermano
<b>o</b>
Prueba de detección neonatal positiva
<b>más</b>
Una concentración elevada de cloruro en sudor en dos o más ocasiones
<b>o</b>
La identificación de mutaciones causantes de FQ en cada gen CFTR
<b>o</b>
Demostración in vivo de anomalías características en el transporte iónico a través del epitelio nasal

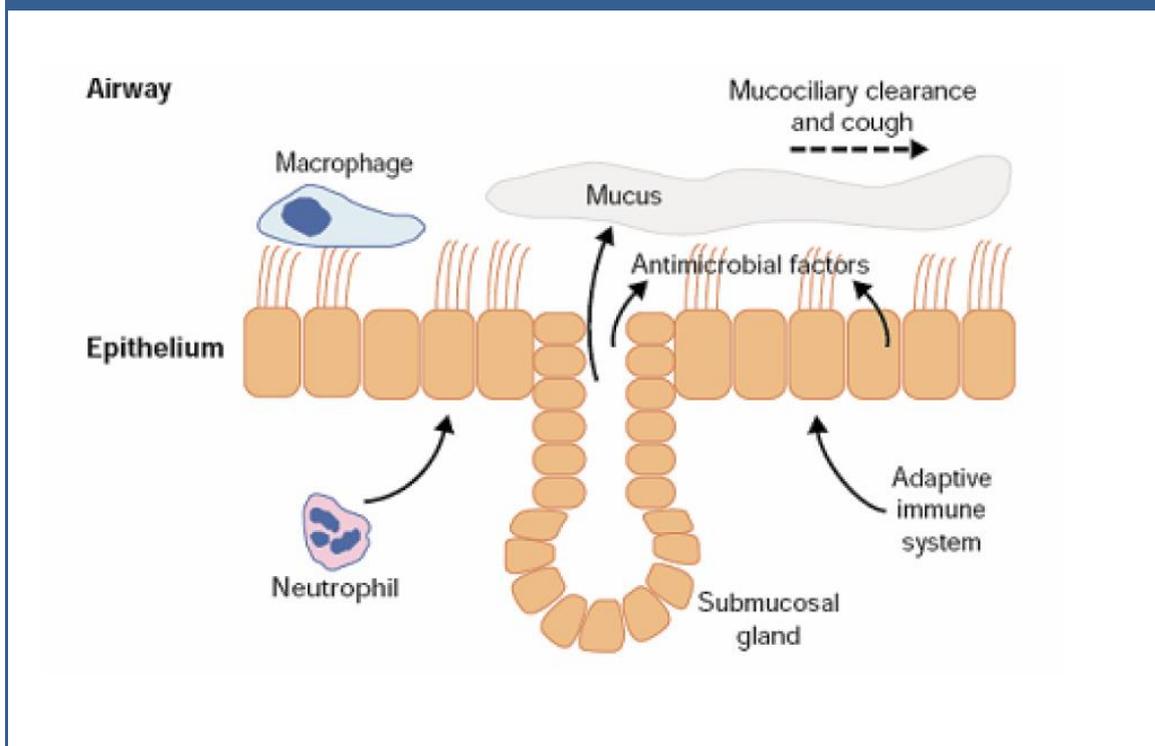
Tomado de: Rosenstein y cols. *J Pediatr* 1998; 132:589-595. (24)

## 2. Patogenia de la Enfermedad Pulmonar en la FQ

### 2.1 Las defensas normales del pulmón

En una persona sana, las vías respiratorias por debajo de la primera división bronquial (o vías respiratorias inferiores) son estériles, a pesar de la continua exposición a microbios transportados por el aire. Esta condición estéril es un resultado de los mecanismos de defensa eficaces de los pulmones que implican (i) un drenaje mecánico, (ii) secreción de mediadores antimicrobianos y (iii) un sistema inmune innato (25) (Figura 4).

Figura 4. Sistema de defensa de las vías respiratorias en humanos



Tomado de: Travis y cols. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 89-95.

#### 2.1.1 Aclaramiento mecánico

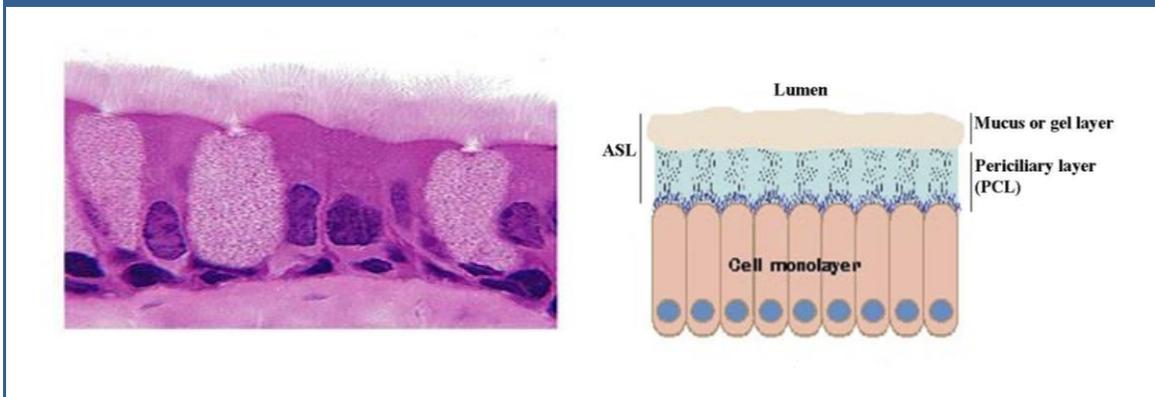
La limpieza mecánica de cualquier cuerpo extraño o patógeno dentro de las vías respiratorias implica reflejos simples, tales como la tos y los estornudos, pero el

mecanismo subyacente de estos reflejos - la limpieza mucociliar (LMC) - es más complejo y aún no se conoce completamente.

El sistema de limpieza mucociliar sirve para atrapar y expulsar partículas inhaladas en la vía aérea. Exige la regulación coordinada del batido ciliar y un volumen de líquido de la superficie de las vías respiratorias (LSA). El espesor del LSA es normalmente de entre 20 a 25 micras y se compone de agua, iones y macromoléculas generados localmente por las células epiteliales de la superficie y / o de las glándulas submucosas.

Se divide en dos compartimentos: una capa líquida periciliar (LPC) a través de la cual los cilios baten libremente; y una capa de moco suprayacente (Figura 5). La acción coordinada del batido del epitelio ciliado conduce las partículas atrapadas en la capa líquida periciliar hacia la faringe y es eventualmente expectorado de las vías respiratorias (26).

Figura 5. Sistema de defensa de las vías respiratorias en humanos



Tomado de: Paradiso y cols. *J Gen Physiol* 2001; 117: 53-67.

### 2.1.2 Los mediadores antimicrobianos

El líquido periciliar también contiene una rica diversidad de proteínas y péptidos antimicrobianos, incluyendo lisozima, lactoferrina, péptidos de neutrófilos humanos,  $\beta$ -defensinas 1 y 2 y catelicidinas. Estos factores proporcionan una primera línea de

defensa contra los microbios inhalados. La contribución de un factor individual depende de su función o capacidad de eliminar microbios. Por ejemplo, las catelicidinas han demostrado que actúan contra *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (27).

### **2.1.3 Sistema inmune innato**

Ciertos microorganismos, por ejemplo especies de *Burkholderia*, han demostrado ser resistentes a los mediadores antimicrobianos. En esas circunstancias, el sistema inmune innato puede jugar un papel importante en la eliminación de estos patógenos. Los componentes del sistema inmune innato de las vías respiratorias incluyen neutrófilos y macrófagos alveolares. Si cualquiera de los neutrófilos o macrófagos están sobresaturados por microbios o partículas extrañas, inician una respuesta inflamatoria mediante la liberación de quimiotoxinas, reclutando más células inflamatorias lo que finalmente conduce a la inflamación crónica si los microbios o partículas son persistentes o las células no pueden eliminarlos (25).

## **2.2 Patogénesis de la enfermedad pulmonar en la FQ**

La patogénesis de la disfunción de los diferentes órganos vista en la FQ se ha estudiado en humanos y ratones knock-out CFTR, pero sigue sin comprenderse totalmente. Parece que las anomalías físicas y químicas de las secreciones de las vías respiratorias en la FQ resultan en una infección crónica con bacterias fenotípicamente únicas, particularmente especies de *Pseudomonas*. Otros factores genéticos, incluyendo polimorfismos del gen alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), pueden aumentar la susceptibilidad a la infección por *P. aeruginosa* y contribuir a las manifestaciones clínicas de la FQ (28).

El mal funcionamiento del CFTR en el epitelio respiratorio se asocia con una variedad de cambios en electrolitos y en el transporte de agua. Los mecanismos involucrados y

la composición final de electrolitos en el líquido de la superficie de las vías respiratorias en la FQ es un tema de investigación en curso. El resultado neto de estos cambios es una alteración en la reología de las secreciones de las vías aéreas, con un aumento en su espesor que dificulta su eliminación (29). Un hallazgo asociado es el aumento de la concentración de cloruro en las secreciones sudoríparas, que constituye uno de los métodos de diagnóstico de la FQ.

La obstrucción crónica de las vías respiratorias causada por secreciones viscosas favorece la colonización pulmonar progresiva con bacterias patógenas, incluyendo *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, y finalmente, *P. aeruginosa* y / o bacterias del complejo *Burkholderia cepacia* complex.

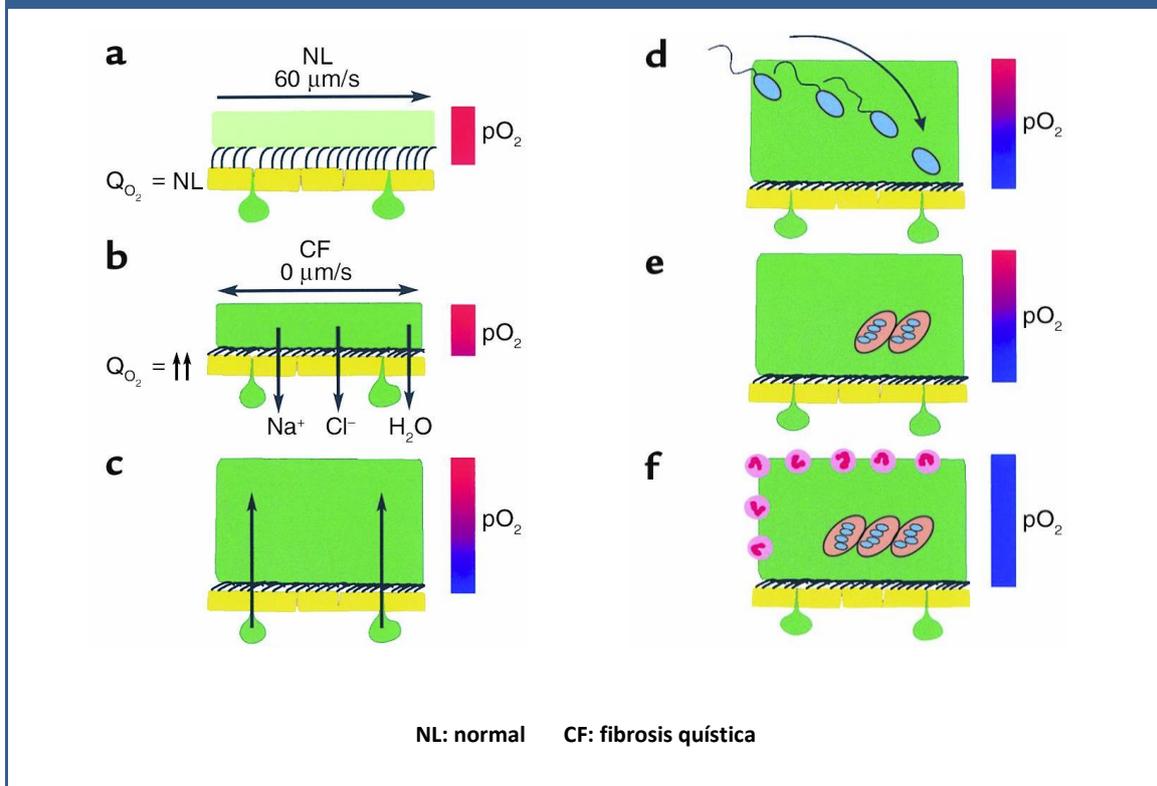
Una vez establecida la infección, los neutrófilos son incapaces de controlar las bacterias, aunque no hay infiltración masiva de estas células inflamatorias en el tejido pulmonar. Los neutrófilos reclutados posteriormente liberan gran cantidad de elastasa, que sobrepasa las antiproteasas del pulmón y contribuye a la destrucción del tejido en un proceso conocido como "actividad de la proteasa endobronquial prolongada" (30). Además, grandes cantidades de proteínas de ADN son liberadas por la degranulación de los neutrófilos a la matriz del citosol, contribuyendo al aumento de la viscosidad del moco de las vías respiratorias.

Se ha señalado que la inflamación se produce con anterioridad al desarrollo de la colonización bacteriana, y puede ser provocada por infecciones virales. A su vez, la infección crónica parece ser el principal estímulo para una respuesta inflamatoria exuberante, pero en última instancia ineficaz lo que posteriormente se traduce en la génesis de las bronquiectasias (31). La respuesta inflamatoria en sí parece contribuir a la progresión de la disfunción pulmonar.

Los individuos con fibrosis quística son particularmente propensos a la infección crónica con *P. aeruginosa*, debido en parte a un aumento de la utilización de oxígeno por las células epiteliales, lo que resulta en una disminución de la tensión de oxígeno dentro de la capa mucosa e hiperviscosa (32) (Figura 6). Esta situación de hipoxia induce los cambios fenotípicos característicos en *P. aeruginosa* (y algunas otras

bacterias gram negativas), incluyendo la producción de alginato y la pérdida de la motilidad. Este fenotipo es coherente con el desarrollo de macrocolonias bacterianas ("biofilms") dentro de las regiones hipóxicas de la capa de moco en las vías respiratorias. Una vez que esto ocurre, la erradicación del microorganismo es casi imposible. La colonización frecuente y la persistencia de la infección por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ también está relacionado con la propia proteína CFTR defectuosa (33).

Figura 6. Modelo patogénico hipotético de la infección por *P. aeruginosa* en FQ



Tomado de: Worlitzsch y cols. *J Clin Invest* 2002; 109:317-325.

**a.** Epitelio normal de las vías respiratorias. Una capa de moco líquido reside encima de la capa de líquido periciliar (LPC). La presencia de LPC de baja viscosidad facilita el aclaramiento mucociliar eficiente. Una tasa normal de consumo de  $\text{O}_2$  epitelial ( $Q_{\text{O}_2}$ ) no produce gradientes de  $\text{O}_2$  dentro de esta delgada superficie líquida (LSA) en las vías respiratorias.

- b.** La depleción de un volumen excesivo del LPC en la FQ, hace que el moco se vuelva adherente a las superficies epiteliales, y el transporte de moco se ralentice. El consumo de O<sub>2</sub> elevado asociado con un transporte de iones acelerado no genera gradientes en la LSA.
- c.** La hipersecreción de moco persistente con el tiempo aumenta el espesor de este y produce tapones endoluminales. El aumento en el consumo de oxígeno genera gradientes escalonados de hipoxia dentro de los tapones mucosos.
- d.** La bacteria *P. aeruginosa* depositada en las superficies mucosas penetran de forma activa y / o pasiva (debido a la turbulencia de moco) en zonas hipóxicas dentro de las masas de moco.
- e.** *P. aeruginosa* se adapta a nichos de hipoxia dentro del moco aumentando la formación de alginato y la creación de macrocolonias.
- f.** Estas macrocolonias resisten a las defensas secundarias, incluyendo neutrófilos, preparando el ambiente idóneo para el establecimiento de la infección crónica. La presencia de una gran densidad de estas macrocolonias y, en menor medida los neutrófilos, hacen que se forme un moco mucopurulento.

### 3. Microbiología de los pulmones en la FQ

Durante las dos últimas décadas ha habido cambios sustanciales en la epidemiología de los patógenos que infectan a los pacientes con FQ (34). El origen de estos cambios es muy probablemente multifactorial. Las posibles explicaciones incluyen una mejora en los métodos diagnósticos de los laboratorio de microbiología clínica, las estrategias de identificación molecular, los cambios en la taxonomía, el aumento de la esperanza de vida, la presión selectiva de los agentes antimicrobianos, los posibles cambios en el entorno natural, y/o la posible transmisión de microorganismos de paciente a paciente. Los patógenos clásicos en la FQ y los patógenos emergentes que a menudo son altamente resistentes a los antimicrobianos se muestran en la Tabla 2. Además, estudios recientes que exploran el microbiana en la FQ han puesto de manifiesto microorganismos que generalmente no se consideraban asociados con la enfermedad pulmonar FQ, particularmente los microorganismos anaeróbicos (35).

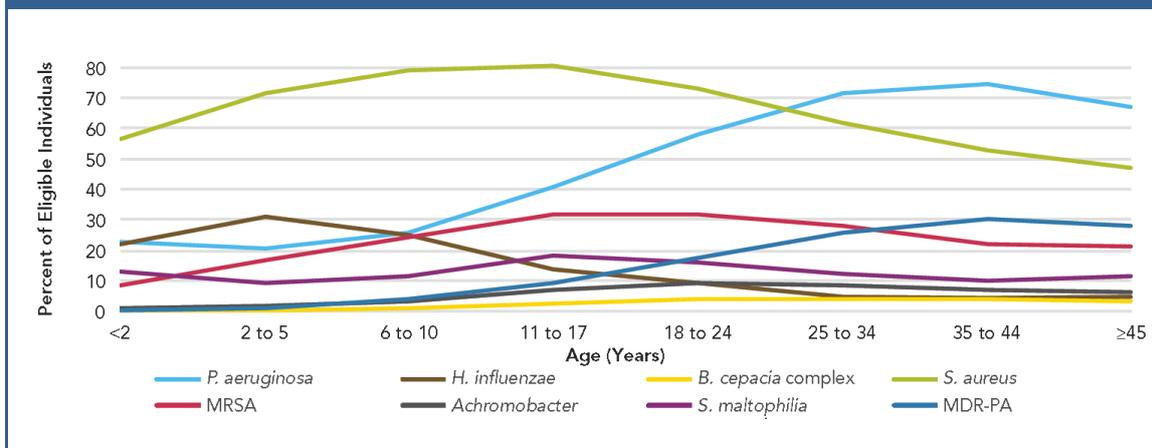
Tabla 2. Patógenos clásicos y emergentes en la FQ

Type of pathogen	Classic pathogen	Emerging pathogen	Pathogen status unknown
Bacteria	<i>P. aeruginosa</i> <i>H. influenzae</i> MSSA <i>B. cepacia</i>	MRSA <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>B. cepacia</i> complex <i>Burkholderia gladioli</i>	
Nontuberculous mycobacteria	Not applicable	MAC <i>M. abscessus</i> complex	
Molds	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Scedosporium prolificans</i> <i>Exophiala dermatitidis</i>
Yeast			<i>Candida</i>

Tomado de: Hodson and Geddes. *Cystic Fibrosis*. CRC Press. Fourth Edition 2015.

La fisiopatología del pulmón en la FQ como se ha descrito anteriormente hace que las funciones de defensa del huésped inhibidas, promuevan un medio ambiente adecuado para el crecimiento microbiano. La prevalencia de patógenos respiratorios bacterianos por edad se muestra en la Figura 7 (9). Los patógenos más comunes son *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y el complejo *B. cepacia*.

Figura 7. Prevalencia de los microorganismos respiratorios por grupos de edad



Tomado de: Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report 2014.

### 3.1 *Staphylococcus aureus*

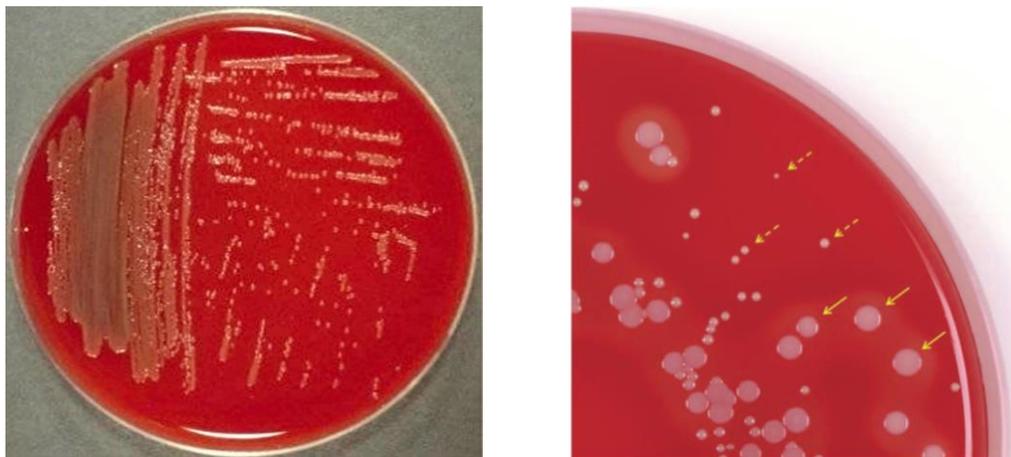
*S. aureus* fue reconocido durante la década de 1940, como el primer patógeno causante de infecciones pulmonares crónicas en niños con FQ. En la época anterior a los antibióticos, *S. aureus* era el patógeno pulmonar más común y fue responsable de la mortalidad de la mayoría de los pacientes con FQ, como se muestra en los estudios de autopsias (36). Hoy en día, *S. aureus* sigue siendo el organismo más común que se encuentra en el 50% de los pacientes con FQ menores de 10 años de edad (Figura 8), y la infección se puede encontrar en los lactantes con FQ a partir de los 3 meses de edad.

*S. aureus* posee una variedad de factores de virulencia. Ácido teicoico (un componente de la pared celular) y las proteínas de unión a fibronectina, se ha visto está asociada con la unión de *S. aureus* a las células epiteliales respiratorias en los pulmones FQ. Una vez consolidado, *S. aureus* segrega factores de virulencia como la catalasa, coagulasa, hemolisina y varias exotoxinas que contribuyen al daño tisular. Por otra parte, las cápsulas que recubren las células bacterianas y factores de virulencia (a saber leucocidinas) facilitan una evasión inmune, lo que contribuye a su persistencia dentro de los huéspedes (37).

Los datos más recientes sugieren que *S. aureus* ya no es una causa significativa de morbilidad o mortalidad en la FQ. Sin embargo, el daño pulmonar causado por *S. aureus* puede predisponer a la infección por *P. aeruginosa* (38), lo que lleva a un peor pronóstico en los pacientes infectados con ambos patógenos en comparación con los pacientes infectados únicamente con *S. aureus*. Por lo tanto, se recomienda el tratamiento precoz y la erradicación de la infección por este microorganismo.

Del mismo modo, la infección por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) ha demostrado un efecto perjudicial significativo en los pulmones de los pacientes con FQ. La prevalencia de la variante de colonia pequeña de *S. aureus* en los pacientes con FQ varía de 17% a 49% (39).

Figura 8. Cultivo *S. aureus* en agar sangre



Fenotipo normal y variedad pequeña colonia  
→                      --->

Tomado de: Jorgensen and Pfaller. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. 11th Edition 2015 (pag. 363).

El significado clínico de la variante de colonia pequeña de *S. aureus* en los pulmones de las personas con FQ ha sido recientemente investigado. Se demostró que las personas con FQ y variante de colonia pequeña de *S. aureus* tenían más edad, menor función pulmonar y peso corporal. Los pacientes con variante de colonia pequeña de *S.*

*aureus* también estaban significativamente más coinfectados con *P. aeruginosa* (80% en pacientes con variante de colonia pequeña de *S. aureus* en comparación con 53% en los pacientes con el fenotipo normal de *S. aureus*), lo que podría contribuir a un peor estado clínico de los pacientes (39).

### **3.2 *Haemophilus influenzae***

*Haemophilus influenzae* es con frecuencia el primer microorganismo aislado de pacientes jóvenes con FQ. La vacuna frente *H. influenzae* no afecta a la adquisición de este organismo dado que en la FQ los pacientes albergan cepas no tipificables. A pesar del frecuente aislamiento de *H. influenzae* en los lactantes y niños pequeños (~35%), el impacto de este organismo en el curso clínico de la FQ ha sido difícil de evaluar, en parte debido a la frecuente aparición de coinfección con otros patógenos. Por otra parte, *H. influenzae* es comúnmente aislado de los niños por lo demás sanos (11%) y adolescentes (47%), lo que complica aún más la evaluación de este organismo como un patógeno en la FQ.

*H. influenzae* es un pequeño, pleomórfico, cocobacilo gram negativo. Es un anaerobio facultativo. Algunas cepas de *H. influenzae* poseen una cápsula de polisacárido que puede ser serotipado en 6 tipos diferentes en función de su estructura bioquímica. La cepa más virulenta es *H. influenzae* tipo b (Hib), que representa más del 95% de *H. influenzae* en las enfermedades invasivas, incluyendo bacteriemia, meningitis, celulitis, epiglotitis, artritis séptica y neumonía (40).

En la FQ, sin embargo, *H. influenzae* más frecuentemente aislado en las infecciones de las vías respiratorias inferiores no está encapsulado y por lo tanto se llama "*H. influenzae* no tipificable (HiNT)". El HiNT es parte de la flora normal del tracto respiratorio superior humano, la colonización de la nasofaringe se detecta hasta en el 80% de los individuos. Sin embargo, pueden causar una amplia gama de enfermedades, incluyendo la otitis media, conjuntivitis, sinusitis, bronquitis y neumonía. En particular, en los pacientes con enfermedades pulmonares subyacentes

como FQ, el HiNT puede colonizar el tracto respiratorio inferior y puede exacerbar la enfermedad. La prevalencia de HiNT aislado de las vías respiratorias inferiores de las personas con FQ es más alta durante el período de la infancia. Se ha visto que hasta un 38% de los neonatos con FQ de un año de edad pueden estar colonizados por el HiNT en sus vías respiratorias inferiores. Esta cifra se reduce al 24% en los niños a la edad de tres y sólo al 10% en los pacientes con FQ mayores de 15 años de edad. Sin embargo, esta cifra baja puede reflejar una dificultad en aislar este microorganismo. De hecho, algunos autores han demostrado que las cepas de HiNT se encontraron en el 30% de los adultos FQ clínicamente estables (41). Teniendo en cuenta que el papel patogénico del HiNT en la FQ aún no está aclarado, se ha planteado la hipótesis de que el HiNT causa la inflamación y el daño en las vías respiratorias y actúa como un organismo de puerta de enlace para otros colonizadores tales como *P. aeruginosa*.

En resumen, aunque las cepas de HiNT forman parte de la flora normal, cada vez hay más evidencia de un papel patogénico del HiNT en individuos FQ, lo que sugiere que las cepas HiNT pueden ser en parte responsables de la progresión de la enfermedad. Por tanto, un consenso europeo recomienda considerar un tratamiento de la colonización temprana o asintomática con HiNT (42).

### **3.3 *Burkholderia cepacia* complex (BCC)**

El género *Burkholderia* se compone de más de 60 especies, la mayoría de los cuales se han descrito en el medio ambiente natural. En los Estados Unidos, el 2,5% de los pacientes con FQ están infectados con cepas del complejo *Burkholderia cepacia* (rango de 0% -13%) (9).

El Complejo *Burkholderia cepacia* (BCC) es un grupo de bacilos gram negativos, y al menos 19 *Burkholderia* spp. se han relacionado con las infecciones del tracto respiratorio en pacientes con fibrosis quística. El término "genomovar" se utiliza comúnmente con el BCC para denotar especies que son fenotípicamente indistinguibles, pero que tienen suficientemente distinción genética (43). Hasta la

fecha, 19 genomovares se han identificado y a cada genomovar se ha dado nombres científicos formales.

BCC es ubicuo en la naturaleza y se puede encontrar en el suelo, el agua, las plantas y los animales. El primer miembro de este grupo, *B. cepacia* (genomovar I), fue descubierto en 1950 como un agente causal de la pudrición bacteriana en bulbos de cebolla; de ahí el nombre "cepacia", que en latín significa cebolla.

BCC es un patógeno humano oportunista y normalmente no infectan a los individuos sanos, sólo a los que están inmunocomprometidos, como los pacientes con FQ. El primer informe de un aislamiento BCC de las vías respiratorias FQ fue de una clínica pediátrica en Toronto, Canadá, en 1984. En ese informe, los autores observaron un aumento de la prevalencia de la infección BCC del 10% al 18% durante un período de diez años, junto con un aumento de la morbilidad y la mortalidad de los infectados. También describieron un síndrome, posteriormente llamado "síndrome cepacia", que se caracteriza por fiebre alta, bacteriemia e insuficiencia respiratoria severa y progresiva que conduce a una tasa de mortalidad de aproximadamente el 20% de los pacientes colonizados (44).

Entre todos los genomovares BCC, *B. cenocepacia* es la especie más comúnmente aislada de las vías respiratorias en la FQ, y la segunda más común es *B. multivorans*. Otra especie del complejo BCC, *B. dolosa* (genomovar VI), se ha recuperado de las vías respiratorias de las personas con FQ y se ha asociado con una disminución acelerada de la función pulmonar y un aumento significativo del riesgo de muerte a corto plazo. (45).

Aunque los niveles de prevalencia de la infección BCC son relativamente bajos en comparación con la prevalencia de la colonización por *P. aeruginosa*, se ha generado una considerable ansiedad entre las comunidades FQ debido a tres grandes preocupaciones:

- (1) el síndrome de cepacia
- (2) la resistencia del BCC
- (3) la infección cruzada en la FQ

### **3.3.1 Síndrome cepacia**

El síndrome cepacia se asocia más frecuentemente con *B. cenocepacia* que con otras especies BCC. Como se mencionó anteriormente, el síndrome cepacia se produce en aproximadamente 20% de los pacientes con infección BCC. Es importante tener en cuenta que la mayoría de las personas con BCC permanecen estables durante muchos años y la infección puede ser transitoria. Aunque varios estudios han demostrado la asociación de unos resultados clínicos peores con la infección por BCC (46).

### **3.3.2 Resistencia antimicrobiana del BCC**

Todas las especies del BCC tienen una resistencia innata a muchos antibióticos e incluso son panresistentes en algunos casos. Esta característica de alta resistencia se deriva de múltiples mecanismos, incluyendo una bomba de expulsión específica, reducción de la permeabilidad de la membrana celular, la inactivación enzimática con la producción de  $\beta$ -lactamasas, y una alteración de la diana celular en las proteínas de unión a penicilina.

### **3.3.3 La transmisión de BCC entre las personas con FQ**

De las diferentes especies del complejo BCC, *B. multivorans* y *B. cenocepacia*, son las dos especies que causan la mayoría de las infecciones en los pacientes con FQ, y han sido las más estudiadas en las investigaciones epidemiológicas. La transmisión de la propagación de persona a persona ha sido bien documentada con *B. cenocepacia* y se ha observado también con *B. multivorans* (47). Una cepa específica designada *B. cenocepacia* Toronto o ET 12 está ampliamente difundida entre las poblaciones FQ, tanto en América del Norte y en Europa. Estudios epidemiológicos tienen documentada su transmisión de persona a persona (48). Estos estudios mostraron que este organismo produce una adhesina inusual, que puede tener un papel importante en su difusión. Estudios posteriores han encontrado que esta adhesina parece ser exclusiva de la cepa ET12 y de los genotipos estrechamente relacionados. Los pacientes infectados con *B. cepacia* tienen significativamente reducida la tasa de supervivencia a largo plazo en comparación con los que no están infectados con este

organismo. Se ha visto que la cepa ET12 se asocia con un aumento de cuatro veces en el riesgo de mortalidad (49).

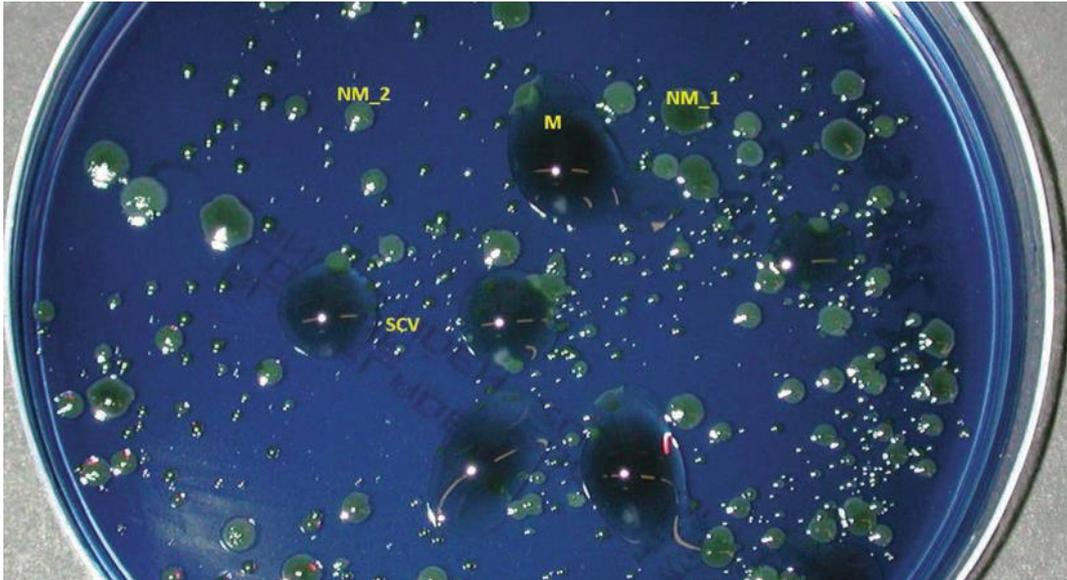
Dado que este microorganismo puede propagarse entre los pacientes, la prevención de su transmisión es de suma importancia teniendo en cuenta el impacto social y terapéutico sobre los pacientes. La segregación de los pacientes FQ infectados con *B. cepacia* de los no infectados ha demostrado ser muy eficaz (50). Por último, en muchos de los centros de trasplante, los pacientes infectados con BCC no se consideran candidatos para el trasplante de pulmón.

### **3.4 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gram negativa causante de infección en pacientes con sistemas inmunes comprometidos y/o barreras epiteliales interrumpidas. Como oportunista versátil, *P. aeruginosa* es capaz de causar infección aguda, que puede resultar en sepsis y la muerte, y una infección crónica que puede persistir durante años (51). Durante la infección aguda, *P. aeruginosa* segrega exotoxinas en el medio ambiente que daña el tejido anfitrión, y *P. aeruginosa* también utiliza una estructura similar a una aguja asociada a la superficie, el sistema de secreción de tipo III, para inyectar directamente toxinas en las células del huésped (51). La infección crónica se cree que está caracterizada por la formación de biofilms, comunidades de bacterias organizadas asociadas a la superficie que residen en el moco espeso del pulmón en la fibrosis quística. Estas biopelículas persisten a pesar de una fuerte respuesta inmune y de la terapia antibiótica agresiva. Los pacientes con FQ están específicamente en riesgo de infecciones respiratorias crónicas con *P. aeruginosa* a causa de los defectos en la respuesta inmune a la infección bacteriana, y una incapacidad para eliminar las secreciones espesas que atrapan microorganismos. Dada la asociación epidemiológica entre la infección respiratoria por *P. aeruginosa* y el aumento de la morbilidad y mortalidad en la población con FQ, se ha puesto énfasis en la prevención de la adquisición de *P. aeruginosa* en el tracto respiratorio, la erradicación temprana, los regímenes terapéuticos para los pacientes con infección

crónica por *P. aeruginosa*, y el tratamiento adecuado de las exacerbaciones pulmonares agudas (Figura 9).

Figura 9. Diferentes morfotipos de *P. aeruginosa*



**M: Mucoide    NM1: Colonia no mucoide    NM2: No mucoide    SCV: Variedad pequeña colonia**

Tomado de: Jorgensen and Pfaller. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. 11th Edition 2015 (pag. 775).

### 3.4.1 Microbiología general

*P. aeruginosa* es un bacilo gram negativo que pertenece al género *Pseudomonas* y la familia *Pseudomonadaceae*. Los miembros del género *Pseudomonas* son habitantes comunes del suelo, pantanos, hábitats marinos costeros y de agua dulce. *P. aeruginosa* tiene el genoma más grande entre todas las bacterias conocidas, lo que contribuye a su extraordinaria versatilidad, adaptabilidad y virulencia. En conjunto, estas razones explican por qué *P. aeruginosa* es un colonizador exitoso y ubicuo (52).

*P. aeruginosa* es el ejemplo perfecto de un patógeno oportunista. La bacteria casi nunca infecta huéspedes sanos. Sin embargo, puede colonizar cualquier tejido con las defensas comprometidas, tales como quemaduras o heridas expuestas. Causa infecciones del tracto urinario, infecciones del sistema respiratorio, la piel y de los tejidos blandos, huesos, bacteriemia y una variedad de infecciones sistémicas sobre todo en personas con sistemas inmunes alterados entre ellas el cáncer y pacientes con SIDA, enfermos quemados y pacientes tratados con agentes inmunosupresores así como las personas con FQ.

Aparte de las personas con FQ que adquieren *P. aeruginosa* de los ambientes naturales, las infecciones por esta bacteria generalmente ocurren en los hospitales. Los pacientes con catéteres permanentes, tales como un tubo endotraqueal, sonda nasogástrica o tubos urinarios, son propensos a la colonización por *P. aeruginosa*. De hecho, *P. aeruginosa* fue el patógeno más común aislado de pacientes hospitalizados (53). La capacidad de crecer en diversos nichos del hospital, incluyendo los desagües, ventiladores o incluso en soluciones antisépticas o desinfectantes, junto con su gran variedad de factores de virulencia secretados y su resistencia a los antimicrobianos, convierten a *P. aeruginosa* en un patógeno nosocomial temido.

### 3.4.2 Sistema Quórum Sensing

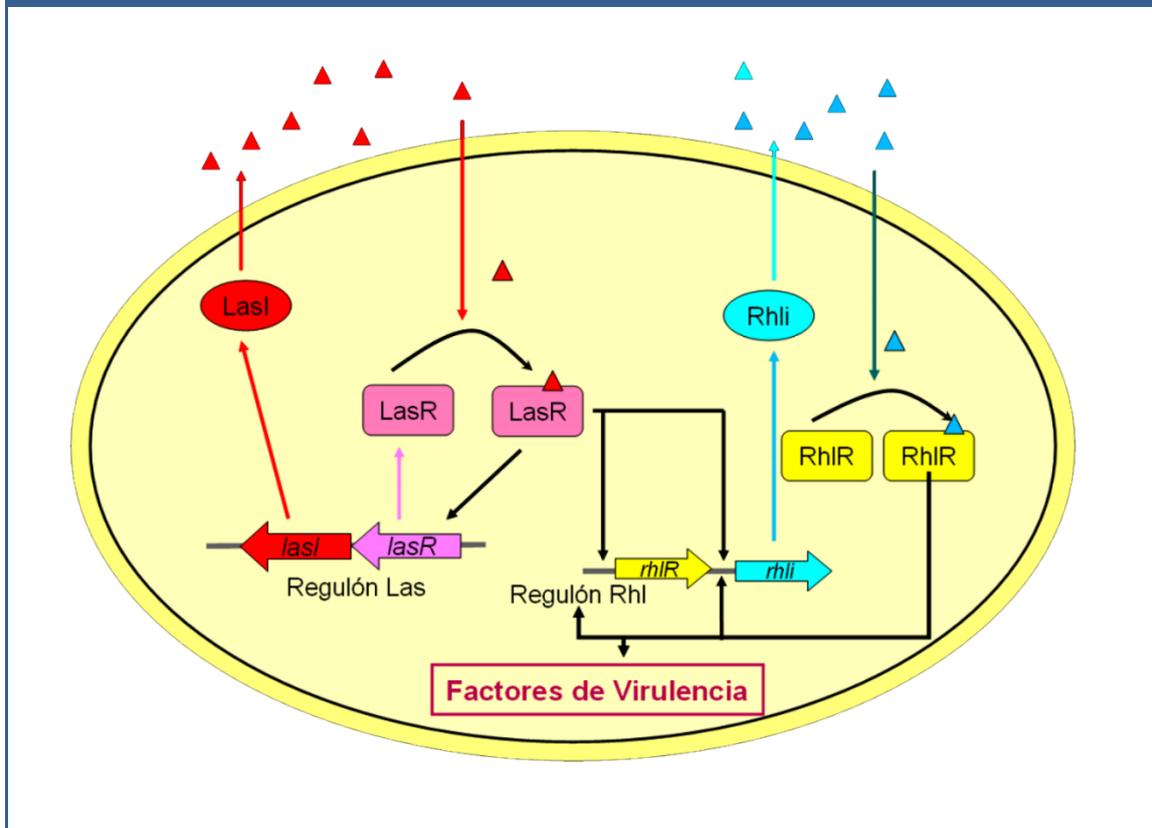
La detección de quórum (QS) es un término que se ha dado al proceso de regulación que las bacterias utilizan para comunicarse entre sí según un sistema dependiente de la densidad celular. Generalmente, las bacterias detectan y responden a su densidad de población a través de pequeñas moléculas difusibles de producción propia, y respondiendo a estas señales químicas específicas, las células bacterianas pueden regular una variedad de funciones fisiológicas o incluso funcionan como un grupo. Se sabe desde hace más de 30 años que las bacterias pueden comunicarse por la liberación y la respuesta a ciertas moléculas de señalización. Este fenómeno, conocido ahora como QS, fue descrito por primera vez en la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri* (54).

Sistema de detección de quórum en *P. aeruginosa*:

El QS en *P. aeruginosa* se compone de dos pares principales de circuitos homólogos a los operones (complejo de genes) del *Vibrio fischeri* LuxI / LuxR, denominados LasI / LasR y RhII / RhIR. De forma similar a la LuxI, tanto LasI y RhII son autoinductores enzimas sintetasa, y los complejos resultantes de ambos LasR-autoinductor y RhIR-autoinductor activan la transcripción de varios genes diana, incluyendo genes que controlan la producción de factores de virulencia y la formación de biopelículas (Figura 10) (55).

Dada la importancia de los QS en la patogénesis de *P. aeruginosa* y otras bacterias, las estrategias diseñadas para interferir con estos sistemas de señalización están destinadas a tener un gran potencial como controladores biológicos. Este campo de investigación tiene un potencial futuro en la lucha contra las infecciones por *P. aeruginosa* en especial en pacientes con FQ.

Figura 10. Patogenia de *P. aeruginosa*. Sistema de detección de quórum



Tomado de: Schauder y cols. *Genes Dev* 2001; 15: 1468-1480.

### 3.4.3 La formación de biopelículas

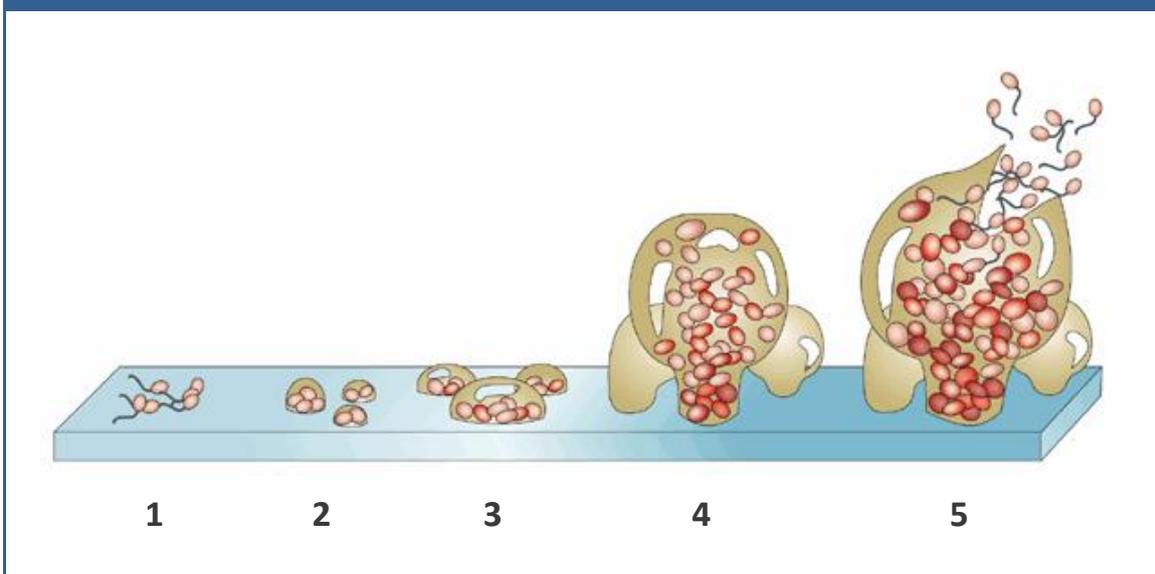
En general, los estudios bacterianos se llevan a cabo por métodos convencionales en los que las bacterias se cultivan en medio líquido o caldo. Las bacterias cultivadas por tales métodos están en un entorno líquido individualmente libres y / o planctónicas. Sin embargo, en la naturaleza y en la mayoría de las enfermedades infecciosas, las bacterias incluyendo *P. aeruginosa*, viven en una "comunidad", adherida a las superficies, y este modo de existencia se llama "biofilms". Las biopelículas, por definición, son una comunidad estructurada de células bacterianas incluidas en una matriz polimérica y adherente de producción propia a una superficie inerte o viva. Las bacterias que crecen en biopelículas se han reconocido cada vez más como una causa importante de enfermedades humanas.

Las bacterias prosperan en el modo de biofilm de crecimiento con el fin de sobrevivir en un ambiente hostil. Se ha sugerido que un crecimiento adjunto a las superficies no sólo proporciona un cierto grado de estabilidad en el entorno de crecimiento para las biopelículas, sino que también puede afectar a las funciones fisiológicas de las células adherentes. Por otra parte, la formación de biopelículas ofrece protección ante las diversas agresiones ambientales como la toxicidad de metales pesados, para protegerse de la respuesta inmune y los agentes antimicrobianos (56).

#### Desarrollo del Biofilm:

Los estudios *in situ* de los biofilms revelan estructuras altamente hidratadas, compuestas de entre un 70% a 90% de materiales extracelulares donde las bacterias crecen como microcolonias intercalados con huecos o canales de agua. Mediante el análisis de genes y la expresión de la proteína y las imágenes microscópicas del biofilm de *P. aeruginosa* durante el proceso de desarrollo, Sauer y cols. propusieron que la maduración de biofilms de *P. aeruginosa* implica cinco etapas diferentes, como se muestra en la Figura 11 (57).

Figura 11. Etapas en el desarrollo del biofilm



Tomado de: Sauer y cols. *J Bacteriol* 2002; 184: 1140-1154.

- 1. Fijación reversible:** Este es un evento inicial en el desarrollo del biofilm; bacterias planctónicas se unen al sustrato en el polo celular utilizando flagelos. En esta etapa, *P. aeruginosa* se fija transitoriamente al sustrato y es capaz de separarse libremente. Se ha demostrado que esta fase de unión es independiente de la señal de QS.
- 2. Adhesión irreversible:** Las células bacterianas se reorientan al eje celular longitudinal, y desaparece su motilidad posiblemente debido a la pérdida de flagelos. Tras esto *P. aeruginosa* se agregan y forman microcolonias.
- 3. Maduración 1:** Se inicia el proceso de formación del biofilm en un ambiente de anaerobiosis relativa.
- 4. Maduración 2:** El biofilm alcanza el espesor máximo durante esta etapa del desarrollo. Los biofilms en esta fase tienen una estructura multicelular en forma de hongo, aunque la formación y el tipo de estructura podrían depender de las distintas fuentes de nutrientes.
- 5. Desprendimiento:** Con el desarrollo de los biofilms, las células individuales o grupos de células planctónicas pueden dispersarse y proceder a formar nuevos biofilms.

Biopelículas de *P. aeruginosa* en los Pulmones con FQ:

*P. aeruginosa* forma biopelículas tanto en el medio natural como en las enfermedades. Varios estudios han demostrado que este patógeno adopta un modo de crecimiento en biofilm en los pulmones de los pacientes con FQ. El examen directo mediante microscopio de barrido de electrones del esputo de pacientes FQ ha confirmado la presencia de estructuras de biofilm y cómo *P. aeruginosa* permanece embebida en la matriz de exopolisacáridos (58).

Las bacterias que crecen en el biofilm han demostrado tener una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos en comparación con las bacterias planctónicas. El fracaso de un agente antimicrobiano para penetrar en el núcleo de las biopelículas se ha

sugerido como uno de los mecanismos responsables de este fenómeno, y la matriz de exopolisacáridos del biofilm podría actuar como una barrera, reduciendo la cantidad de agente antimicrobiano que interactúa con las bacterias en su interior (59). La matriz de exopolisacáridos que encierra los biofilms de *P. aeruginosa* también ha demostrado que es capaz de proteger a las biopelículas de la respuesta inmune del huésped. En última instancia, la formación de biofilms es responsable de la persistencia de *P. aeruginosa* en los pulmones con FQ.

#### **3.4.4 Adquisición de *P. aeruginosa* en la FQ**

Debido a que *P. aeruginosa* vive en el agua y el suelo y, que se puede encontrar en verduras y plantas, así como en los desagües de agua o superficies húmedas, las personas pueden contraer este microorganismo a partir de diversas fuentes. Por lo tanto, es generalmente aceptado que las personas con FQ adquieren este patógeno de su entorno. Los alimentos y el agua potable también pueden ser una fuente de *P. aeruginosa*. Varios estudios han reportado contaminación por *P. aeruginosa* en los alimentos o incluso el agua destilada de los hospitales (60).

Después de penetrar en los pulmones, las bacterias deben adherirse a los anfitriones con el fin de establecer una colonización exitosa y resistir las defensas innatas del huésped. En las personas sanas, las bacterias que entran en el pulmón se eliminan mediante la depuración mucociliar. Sin embargo, en los pulmones con FQ el mecanismo de depuración mucociliar se ve afectado, y se ha demostrado que *P. aeruginosa* puede adherirse fácilmente a la mucosa bronquial. La adherencia entre *P. aeruginosa* y las células de la superficie mucosa del huésped es importante en la colonización bacteriana y la infección posterior.

En conclusión, es probable que las personas con FQ adquieren *P. aeruginosa* del medio ambiente. Sin embargo, el riesgo de contraer este organismo varía en los diferentes entornos. El riesgo de adquisición a partir de otras personas u otros pacientes con FQ también existe.

### **3.4.5 Infección intermitente por *P. aeruginosa***

Se ha visto que la adquisición y la colonización de *P. aeruginosa* puede ocurrir tan pronto como en el primer año de vida. Los estudios longitudinales tras la infección por *P. aeruginosa* en jóvenes y niños con FQ demostraron que los niños infectados tuvieron algunos períodos de tiempo intermitentes durante los que las bacterias eran indetectables. Este período de infección transitoria es el momento óptimo para la erradicación exitosa de *P. aeruginosa* y de este modo preservar la función pulmonar y retrasar el inicio de la infección crónica (61). Desafortunadamente, esta etapa de la infección temprana es temporal y, sin tratamiento, el patógeno a menudo persiste y, finalmente, se produce una infección crónica.

Una revisión reciente de la literatura, apoya la hipótesis de que *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ, coloniza inicialmente los senos paranasales, y ésta colonización inaugural de la vía aérea superior parece ser un predictor de la colonización pulmonar posterior a partir de este reservorio. (62).

### **3.4.6 La infección crónica por *P. aeruginosa***

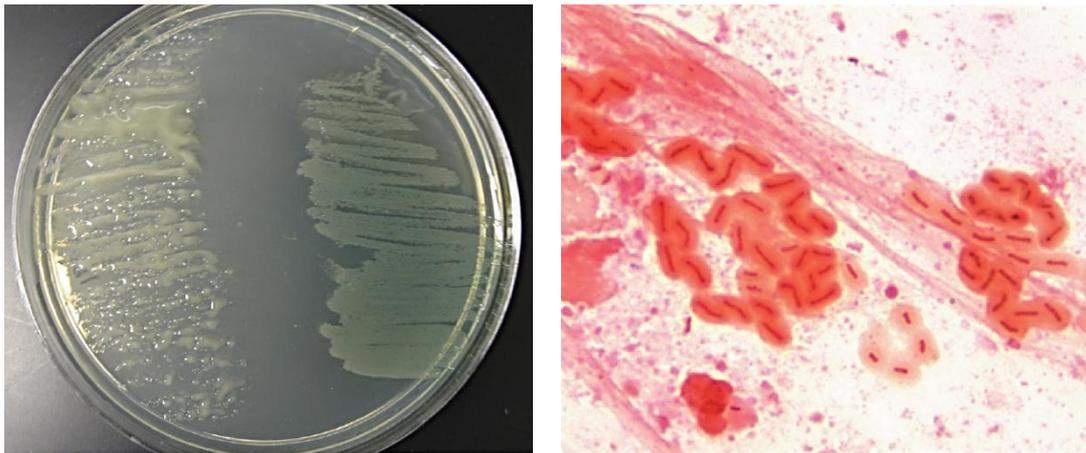
Una vez *P. aeruginosa* establece una infección crónica en los pulmones, las infecciones bacterianas del mismo linaje persisten durante años y no se puede erradicar por ninguna terapia conocida. El rasgo más característico de la infección crónica por *P. aeruginosa* en los pulmones con FQ es la conversión de un fenotipo no mucoide al fenotipo mucoide y la formación de biopelículas. El carácter mucoide es resultado de la producción de un exopolisacárido mucoide llamado "alginato", y se ha demostrado que el nivel de la producción de alginato se correlaciona clínicamente con un peor pronóstico en pacientes con FQ. Es importante destacar que, las bacterias presentan adaptaciones mediante la producción de alginato y la formación de biofilms. Estas dos circunstancias, la producción de alginato y la formación de biofilms en un medio anaeróbico confieren a la bacteria estrategias para evadir los mecanismos de defensa

y la acción de los antibióticos, y en última instancia contribuyen a la persistencia de *P. aeruginosa* dentro de los pulmones con FQ (32).

### 3.4.7 Conversión de *P. aeruginosa* en fenotipo mucoso

*P. aeruginosa*, aislada del entorno o en pacientes con enfermedades distintas de la FQ o incluso de la infección pulmonar inicial en la FQ, típicamente parece ser plana o no mucosa. En contraste, la mayoría de las cepas que se recuperan de los pulmones con FQ e infección crónica presentan la morfología mucosa (63) (Figura 12).

Figura 12. Cultivo y tinción de gram *P. aeruginosa* mucosa



Tomado de: Hauser y cols. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24:29-70.

Se cree que la cepa mucosa de *P. aeruginosa* se transforma de la cepa no mucosa, que coloniza en los pulmones en una etapa temprana porque se ha demostrado mediante una técnica de genotipado molecular que los aislados mucosos eran genotípicamente similares a los aislados inicialmente adquiridos. Sin embargo, no hay un intervalo claramente definido entre la colonización inicial no mucosa y la transición a formas mucosas. Como ya se ha señalado, la producción de alginato está relacionada con el crecimiento de bacterias en condiciones de anaerobiosis.

Función del alginato:

Pedersen y cols. demostraron que el curso clínico de los pacientes con FQ empeoró significativamente cuando emergieron *P. aeruginosa* con producción de alginato en las vías respiratorias (64). Se encontró que la fagocitosis tanto directa como mediada por opsoninas era inhibida debido a la cápsula de alginato alrededor de las colonias bacterianas. Es importante destacar que, el alginato, responsable del crecimiento en biopelículas de *P. aeruginosa*, es altamente resistente a las defensas inmunitarias del huésped y a los antibióticos.

### **3.4.8 Anticuerpos séricos frente a *P. aeruginosa*. Precipitinas**

#### **3.4.8.1 Antecedentes**

La medición de anticuerpos frente a los patógenos se realiza principalmente con fines diagnósticos para detectar la etiología de las infecciones o para confirmar que la protección después de la vacunación está presente en contra de una determinada enfermedad.

En algunas enfermedades crónicas tales como la infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, los anticuerpos inducidos por la infección, obviamente, no ofrecen ninguna protección contra la infección. Por el contrario, los niveles altos y el rápido aumento de los anticuerpos se correlacionan con un mal pronóstico (65). La razón de esto es que la eliminación por el sistema inmune no está mediada por la respuesta de anticuerpos debido a que el alginato producido por las bacterias, que es una característica de esta enfermedad, les permite crecer dentro de biofilms en los bronquiolos. El modo de crecimiento en biofilms es una estrategia de supervivencia antigua desarrollada por las bacterias que viven en el medio ambiente para explotar el micro entorno de nutrientes en las superficies y para evitar ser destruidas por otros organismos y los productos químicos tóxicos (66). Como consecuencia, las reacciones antígeno-anticuerpo se llevan a cabo alrededor de la

superficie del biofilm de *P. aeruginosa* en las vías respiratorias de los pacientes con FQ, lo que finalmente conduce a la inflamación crónica dominada por leucocitos polimorfonucleares. El intento fallido de fagocitosis alrededor del biofilm conduce a la liberación de enzimas proteolíticas tales como la elastasa y radicales de oxígeno que destruyen gradualmente el tejido pulmonar en la FQ (66). Por lo tanto, la respuesta de anticuerpos contra *P. aeruginosa* en la FQ es a la vez un marcador de la cronicidad de la infección y un marcador de la inflamación y daño tisular. Esta determinación de anticuerpos contra *P. aeruginosa* en pacientes con FQ se realiza en algunos centros para distinguir entre colonización intermitente por *P. aeruginosa*, que no da lugar a una respuesta de anticuerpos significativa y la infección crónica por *P. aeruginosa*, que se caracteriza por una respuesta de anticuerpos significativa (67). El valor predictivo tanto positivo como negativo de la prueba de anticuerpos para discriminar entre la colonización intermitente y la infección crónica es de aproximadamente un 90% (68).

Esto tiene importantes consecuencias terapéuticas, ya que es posible evitar la infección crónica por *P. aeruginosa* en casi el 80% de los pacientes con un tratamiento antibiótico precoz y agresivo de la colonización intermitente. De la misma manera, mediante un tratamiento antibiótico de supresión de la infección crónica por *P. aeruginosa*, es posible mantener la función pulmonar durante muchos años y de este modo mejorar el pronóstico de los pacientes FQ, aunque prácticamente nunca es posible erradicar la infección (69).

#### **3.4.8.2 Métodos diagnósticos para la determinación de anticuerpos séricos**

Es bien conocido que el cultivo de las muestras respiratorias, especialmente el frotis faríngeo tiene varias limitaciones que incluyen la existencia de falsos negativos. Éste aspecto es crucial, dado el interés de una detección precoz de la colonización inicial por *P. aeruginosa* para así evitar que la infección progrese hacia la cronicidad. De otro lado, el aislamiento de *P. aeruginosa* en secreciones respiratorias no implica necesariamente que haya infección a menos que exista una respuesta específica de

anticuerpos (70). Ante estas limitaciones en los cultivos de las muestras respiratorias en los pacientes FQ, surge como una herramienta alternativa y de apoyo al diagnóstico microbiológico, la determinación serológica de los anticuerpos frente a *P. aeruginosa* (68).

Un aspecto a considerar es la gran diversidad en los resultados de los diferentes estudios, debido a diferencias metodológicas, casuísticas, tiempos de seguimiento y antígenos empleados (Tabla 3). A pesar de estos inconvenientes, varios estudios destacan la importancia y el potencial diagnóstico de la medición de anticuerpos para la detección inicial de *P. aeruginosa* antes incluso que los cultivos microbiológicos se positivicen, en un tiempo que oscila entre 5 y 30 meses. La respuesta a los antígenos más usados (Exo A, ELA, AP-M 15 Medignost y St-Ag: 1-17) evidencia en los diferentes estudios una buen grado de sensibilidad y especificidad (71).

Desde un punto de vista clínico, se ha demostrado que existe una buena correlación entre el nivel de anticuerpos frente a los antígenos de *P. aeruginosa* (St-Ag: 1-17) y el estatus clínico, detectándose valores elevados en relación a una peor función pulmonar o alteraciones en la Rx. de tórax, incluso con un tiempo de seis meses de antelación al primer cultivo positivo para *P. aeruginosa*, lo cual se asocia con peor pronóstico y una peor función pulmonar (72).

Las evidencias de la utilidad potencial de la determinación de los anticuerpos frente a *P. aeruginosa*, dan soporte a sugerir la incorporación de esta herramienta diagnóstica en el seguimiento de rutina de los pacientes con FQ, en un esfuerzo por reducir la prevalencia de la infección crónica por *P. aeruginosa* y para conocer de forma más precisa el proceso de colonización/ infección.

No obstante, actualmente existe consenso en que los resultados prometedores de las determinaciones serológicas de anticuerpos, deben ser confirmados mediante estudios longitudinales junto con otras técnicas diagnósticas auxiliares, y que por el momento

no se pueden adoptar como único criterio tanto para el diagnóstico como para decidir el momento de iniciar el tratamiento (73).

Tabla 3. Métodos para la detección de anticuerpos séricos frente *P. aeruginosa*

MÉTODO	TIPO DE ENSAYO	DETERMINACIÓN	EJEMPLOS
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	Inmunoenzimático	Antígenos o anticuerpos unidos a un conjugado marcado con una enzima	Inmunoglobulinas y exoproteínas
Western blot	Separación de proteínas seguido por ensayo inmunoenzimático	Anticuerpos contra proteínas de células enteras	Inmunoglobulinas
Radioinmunoensayo (RIA)	Inmunoradiometría	Antígenos o anticuerpos marcados con radioisótopos	Inmunoglobulinas y exoproteínas
Inmunolectroforesis cruzada (CIE)	Inmunoprecipitación	Precipitados resultantes de la Interacción antígeno-anticuerpo	Precipitinas

Tomado de: Mauch y cols. *Journal of Cystic Fibrosis* 2014;13:499-507.

## 4. Resistencia Antibiótica

Epidemiología de la Resistencia:

Las enfermedades infecciosas han sido una causa importante de morbilidad y mortalidad a lo largo de nuestra historia. Con la expansión de la era de los antibióticos durante el siglo XX, hubo una creciente confianza en que la necesidad de especialistas en enfermedades infecciosas desaparecería. Sin embargo, nadie podía predecir el impacto que una población creciente de sujetos inmunocomprometidos tendría sobre el resurgimiento de enfermedades infecciosas durante las últimas 3 décadas. Por otra parte, la capacidad de los patógenos bacterianos para adaptarse y superar los desafíos de antibióticos en su entorno ha sido poco menos que impresionante. Ahora nos enfrentamos a una creciente población de bacterias resistentes que amenazan con entrar en lo que algunos consideran la "era postantibiótica" de las enfermedades infecciosas.

Algunos de los patógenos resistentes a los medicamentos más problemáticos en la actualidad incluyen: *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a múltiples fármacos, y *Enterococcus* spp. resistente a la vancomicina entre las bacterias gram positivas y, *Acinetobacter baumannii* resistente a múltiples fármacos, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*, entre las bacterias gram negativas (74).

### 4.1 Mecanismos de resistencia antibiótica

La aparición de fenotipos de resistencia a los antimicrobianos está inevitablemente ligada al uso clínico (u otro) del agente antimicrobiano contra el que se dirige la resistencia. Una causa importante de la propagación de la resistencia a los antimicrobianos es la falta de adhesión a las normas adecuadas para el control de la infección, tanto dentro como fuera de los hospitales. La propagación de estos patógenos problemáticos ha sido atribuida a la transmisión de paciente a paciente,

presumiblemente durante la asistencia sanitaria debido a la colonización transitoria o persistente de los trabajadores de la salud (75).

Aunque la resistencia a los antibióticos es predominantemente un problema nosocomial, las bacterias resistentes también se propagan en el entorno de la comunidad. Entre los sitios en los que se sabe que se pueden transmitir las bacterias resistentes se incluyen los centros de día (76).

Finalmente una fuente importante en la aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos son los nichos no humanos en los cuales se utilizan antibióticos. Ahora está bien establecido que los antimicrobianos de uso en animales se asocian tanto con la resistencia en especies de bacterias que contaminan los alimentos e infectan a los humanos, principalmente *Salmonella* y *Campylobacter*, como con la transferencia de determinantes de resistencia a especies de *Enterococcus* humanos (77).

#### Mecanismos de la Resistencia Antibiótica:

##### a) Modificación del antibiótico.

Se han descrito muchas enzimas modificadoras de los antibióticos, incluyendo las betalactamasas, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos (AMEs), y cloranfenicol acetiltransferasas (CATs). Aunque estas enzimas son en muchos casos adquiridas, algunas son intrínsecas a ciertos géneros. Por ejemplo, betalactamasas cromosómicas son intrínsecas a casi todos los bacilos gram negativos. En algunos géneros bacterianos (especialmente *Enterobacter* y *Pseudomonas*), las betalactamasas cromosómicas están normalmente bajo control, pero cuando se producen alteraciones en estos mecanismos de regulación dan como resultado resistencia de alto nivel a los betalactámicos de amplio espectro (78).

b) La modificación de la molécula diana.

La interacción del antibiótico con moléculas diana es generalmente a través de alteraciones menores, bastante específicas de la molécula diana y puede tener efectos importantes en la unión a los antibióticos. Existen numerosos ejemplos de modificación de la diana a los antibióticos como un mecanismo de resistencia, incluyendo la eritromicina ribosomal metilasa que confiere resistencia a los antibióticos macrólidos, lincosaminas y estreptograminas B (79). Las modificaciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBP) pueden afectar a la afinidad de estas moléculas a los antibióticos betalactámicos, como ya se ha visto anteriormente para *S. pneumoniae* y especialmente para *E. faecium* resistente a la ampicilina, a través de mutaciones en las PBP 5 (80). Modificaciones de las PBP parecen ser un mecanismo de resistencia importante a betalactámicos en las bacterias gram positivas, mientras que la producción de betalactamasas es especialmente relevante en los bacilos gram negativos.

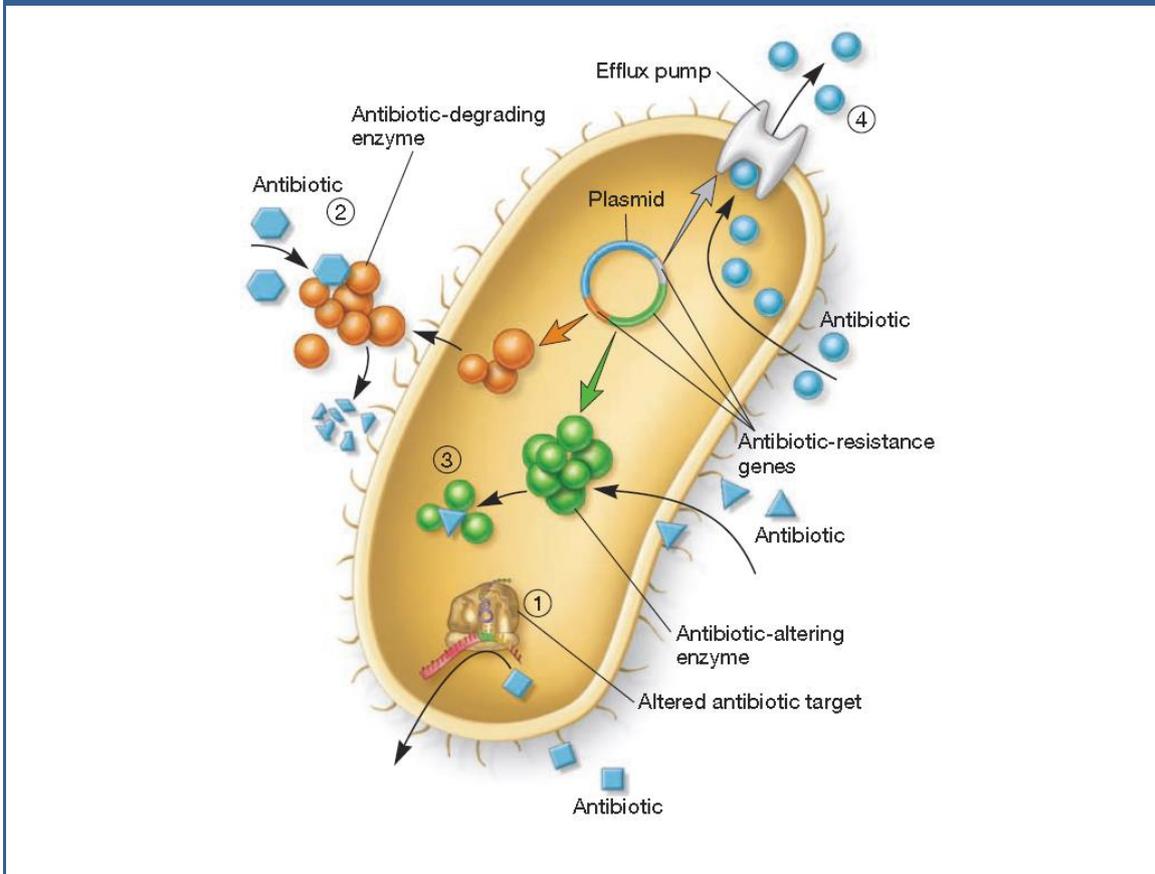
Otros ejemplos importantes de modificación de la diana incluyen alteraciones de los precursores de la pared celular que confieren resistencia a los antibióticos glicopéptidos; las mutaciones de la ADN girasa y la topoisomerasa IV que confieren resistencia a las fluoroquinolonas, los mecanismos de protección ribosomal que confieren resistencia a las tetraciclinas, y las mutaciones en la ARN polimerasa que confieren resistencia a la rifampicina.

c) Acceso restringido al punto diana de la bacteria.

Es axiomático que un antibiótico debe alcanzar su objetivo en la bacteria para que sea eficaz. Por lo tanto, para cumplir ese objetivo el antibiótico debe atravesar la barrera que supone la pared celular. El fortalecimiento de estas barreras puede ser un mecanismo muy eficaz de resistencia (81) (Figura 13). Todas las bacterias gram negativas tienen una membrana externa que debe ser atravesada antes de alcanzar la membrana citoplasmática. Las reducciones en las cantidades de porinas (canales para la circulación de los materiales a través de la membrana) han sido documentados

como importantes contribuyentes a la resistencia a imipenem en *P. aeruginosa*, cefepime en *Enterobacter cloacae*, y la ceftaxidima o ceftazidima en *K.pneumoniae* (82).

Figura 13. Mecanismos de resistencia antimicrobiana



Tomado de: Willey JM: Prescott, Harley, & Klein's Microbiology. McGraw-Hill. 7th edition 2008.

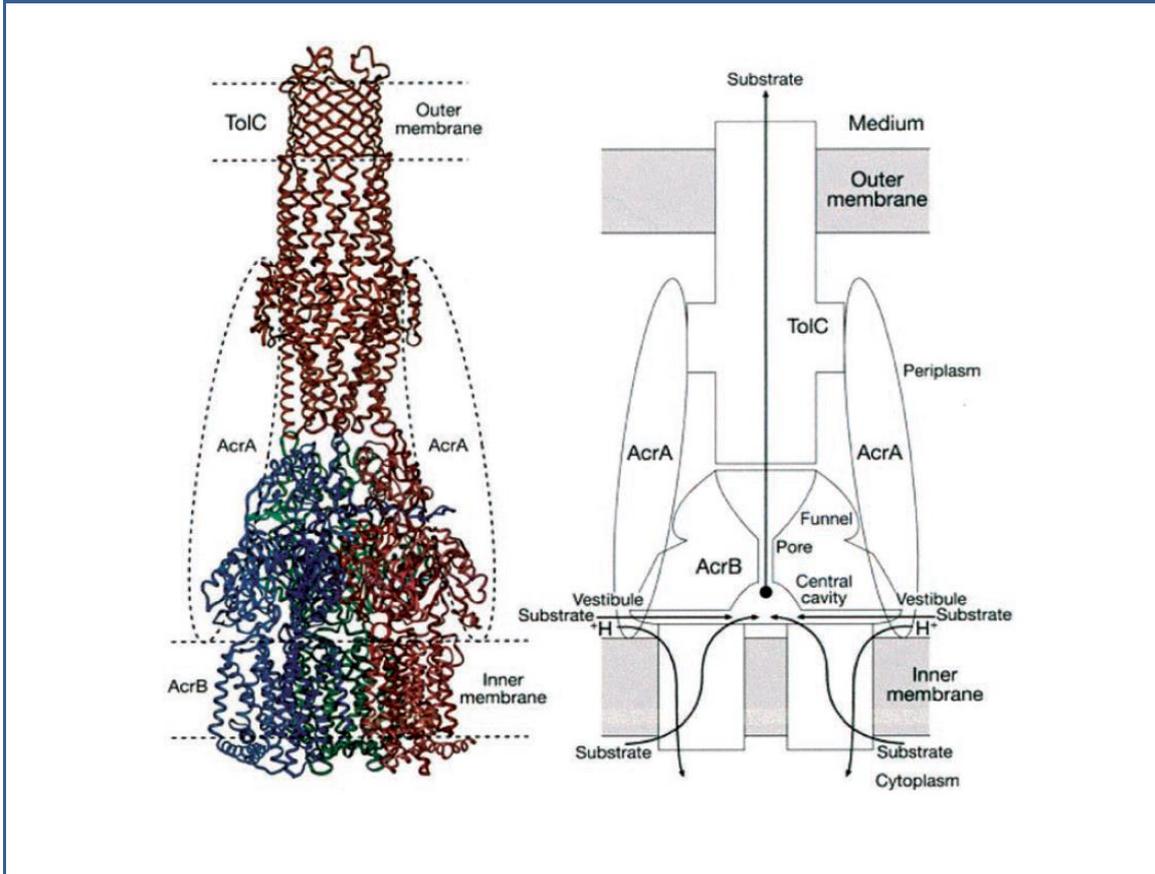
d) Las bombas de expulsión.

Entre las áreas más activas de la investigación en resistencia antimicrobiana está la identificación y caracterización de las bombas que expulsan una o más clases de antibióticos del interior de las bacterias (83) (Figura 14). Se han descrito varias clases de bombas para microorganismos gram positivos y / o bacterias gram negativas. La mayoría de estas bombas se encuentran en la membrana citoplasmática y utilizan los protones como fuerza motriz para expulsar el fármaco.

Las principales familias de estos transportadores de salida son (i) la superfamilia transportadora principal (MFS), que incluye QacA y NorA / Bmr de las bacterias gram

positivas y EmrB de *E. coli*; (ii) las bombas de resistencia a múltiples fármacos, incluyendo Smr de *S. aureus* y EmrE de *E. coli*; y (iii) las bombas de resistencia que modulan la división celular (RND), incluyendo AcrAB-TolC de *E. coli* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa*.

Figura 14. Estructura de la bomba de expulsión multifármaco



Tomado de: Murakami y cols. *Nature* 2002; 419:587–593.

#### 4.2 Multirresistencia antibiótica

La resistencia antimicrobiana a nivel mundial, a pesar de cierta variabilidad geográfica, incluyendo la resistencia a múltiples fármacos (tres o más clases de antimicrobianos) de *P. aeruginosa*, está muy extendida y va en aumento (84).

La multirresistencia ha adquirido tal importancia que la OMS ha identificado este problema como la 5ª amenaza para la salud humana y sus consecuencias generan múltiples campañas para intentar controlar esta situación (85). La importancia de la multirresistencia radica en que provoca un claro aumento de la morbi-mortalidad de los pacientes tanto en el ámbito hospitalario como ambulatorio y la repercusión en los costes sanitarios es un problema añadido para la salud pública. Al existir tan alto grado de resistencia se ven limitadas las posibilidades terapéuticas con un déficit claro de antibacterianos efectivos para estos microorganismos (86).

*Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (PAMR) forma parte de un grupo de microorganismos llamados “conflictivos” (junto a *Enterococcus* resistente a la vancomicina (ERV), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), *Enterobacterias multirresistentes* (BLEE) y *Acinetobacter baumannii*), que tienen en común la gravedad de las infecciones causadas y las dificultades terapéuticas. Su prevalencia a escala mundial está poco aclarada, ya que no existe un consenso en la definición de multirresistencia. Se han diseñado múltiples estudios con diferentes definiciones que dificultan el conocimiento del verdadero impacto clínico de este problema.

Dentro de las definiciones de multirresistencia la más utilizada es la presencia de resistencia demostrada ante antibióticos de tres o más familias de antipseudomónicos entre los que se incluyen penicilinas antipseudomónicas (piperacilina), cefalosporinas (ceftazidima, cefepime), carbapenems (imipenem, meropenem, doripenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina), monobactámicos (aztreonam) y polimixinas (colistina) (87).

De acuerdo con un informe de la “European Antimicrobial Resistance Surveillance System” (EARSS), se ha informado de altos porcentajes de resistencia de *P. aeruginosa*, especialmente en los países de Europa meridional y oriental; 34,7% de los aislados de *P. aeruginosa* fueron resistentes a uno o más de las cinco clases de antimicrobianos considerados (fluoroquinolonas, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, carbapenems y aminoglucósidos). La resistencia combinada era frecuente; 15,3% de los aislados eran

resistentes al menos a tres clases de antimicrobianos y el 4,6% de las cepas fueron resistentes a las cinco clases de antimicrobianos. El porcentaje de cepas con resistencia combinada frente al menos a tres de las cinco clases variaba considerablemente entre países, desde <1% en algunos países a > 50% en otros países. Los antecedentes genéticos de la multirresistencia ó panresistencia de *P. aeruginosa* se ha demostrado que es un combinación de hiperproducción de AmpC, OprD inactivación, mutaciones que confieren alto nivel de resistencia al locus diana de las fluoroquinolonas, las mutaciones implicadas en la sobreexpresión de las bombas de expulsión, y la producción de enzimas que hidrolizan a los aminoglucósidos (88).

#### **4.3 Mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* representa un serio desafío terapéutico dentro del tratamiento de las infecciones adquiridas en la comunidad y nosocomiales, y la selección del antibiótico adecuado para iniciar el tratamiento es esencial para optimizar el resultado clínico. Desafortunadamente, la selección del antibiótico más adecuado se complica por la capacidad de *P. aeruginosa* para desarrollar resistencia a múltiples clases de agentes antibacterianos, incluso durante el curso del tratamiento de una infección. Algunos estudios epidemiológicos han demostrado que las infecciones causadas por *P. aeruginosa* resistente a los medicamentos se asocian con un aumento significativo en la morbilidad, mortalidad, necesidad de intervención quirúrgica, la duración de la estancia hospitalaria y la atención crónica, y el coste total del tratamiento de la infección. Aún más problemático es el desarrollo de la resistencia durante el curso de la terapia, una complicación que se ha demostrado duplica la duración de la hospitalización y el coste general de la atención del paciente (89). *P. aeruginosa* puede desarrollar resistencia a los antibacterianos, ya sea a través de la adquisición de los genes de resistencia en elementos genéticos móviles (es decir, plásmidos) o a través de procesos mutacionales que alteran la expresión y / o función de los mecanismos codificados cromosómicamente. Ambas estrategias para el desarrollo de resistencia a

los medicamentos pueden limitar severamente las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones graves.

#### **4.3.1 Resistencia intrínseca**

La resistencia intrínseca es mediada a través de múltiples mecanismos. *P. aeruginosa* tiene una AmpC betalactamasa inducida cromosómicamente, que la hace resistente a la ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, y cefalosporinas de primera y segunda generación, así como a la cefotaxima y ceftriaxona. A pesar de que se pensó originalmente que la impermeabilidad era responsable de la resistencia a otras clases de antibióticos, los sistemas de bomba de eflujo han sido identificados como el mecanismo de resistencia intrínseco más frecuente. En el caso de *P. aeruginosa* el mayor número de bombas de expulsión, se incluyen dentro de la familia RND (Resistance-Nodulation-Division). Estos sistemas de expulsión multifármaco pueden resultar en expulsión de los betalactámicos, cloranfenicol, las fluoroquinolonas, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclina, trimetoprim, y aminoglucósidos (90). La secuenciación del genoma de *P. aeruginosa* indica que una alta proporción de genes, incluidos los genes reguladores, están involucrados en el flujo de salida de compuestos orgánicos, lo que representa la capacidad de este organismo para adaptarse a diversos ambientes y resistir a la acción de los agentes antimicrobianos. Los sistemas de eflujo también exportan determinantes de virulencia de *P. aeruginosa*, potenciando su toxicidad frente al huésped.

#### **4.3.2 Resistencia adquirida**

Varios antibióticos superan la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* y son activos contra este organismo. Éstos incluyen penicilinas de amplio espectro (piperacilina y ticarcilina), ciertas cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima y cefepima), carbapenems (imipenem, meropenem, y doripenem), monobactámicos (aztreonam), fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino), aminoglucósidos

(gentamicina, tobramicina y amikacina), y colistina. Por desgracia, puede desarrollarse la resistencia mutacional a los diferentes antipseudomónicos.

#### **4.3.3 Mecanismos de Resistencia de *P. aeruginosa* en la FQ**

Los pacientes con fibrosis quística corren un alto riesgo de desarrollar infecciones por patógenos resistentes a múltiples fármacos, especialmente por *P. aeruginosa*, debido a los frecuentes y, a menudo prolongados cursos de antibióticos por vía oral, intravenosos o aerosolizados que se utilizan para tratar la enfermedad pulmonar crónica. Como resultado, el tratamiento de las exacerbaciones pulmonares agudas en pacientes infectados con cepas resistentes a múltiples fármacos puede ser muy difícil, ya que los médicos se enfrentan con opciones limitadas de antimicrobianos sobre la base de las pruebas de sensibilidad convencional. Este patógeno es un maestro en el desarrollo de resistencia por mutaciones espontáneas o tras la adquisición de plásmidos (ADN extracromosómico) que albergan los genes de resistencia (91).

Algunos mecanismos de resistencia están codificados cromosómicamente, y su expresión puede ser inducida por la exposición a los antibióticos. Dos de esos mecanismos, los sistemas de expulsión y las betalactamasas, son algunos de los mecanismos de resistencia más frecuentemente detectados en los aislados de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ (Tabla 4).

Tabla 4. Mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* a los antimicrobianos

MECANISMO GLOBAL	EJEMPLOS DE MECANISMO MOLECULAR
Modificación del antibiótico por enzimas bacterianos.	Betalactamasas (penicilinasas y cefalosporinasas), hidrolizan el anillo betalactámico, que ya no puede unirse a las proteínas de unión a penicilina.
	Enzimas modificadoras de los aminoglucósidos, que hacen que estos antibióticos no se puede unir a ARNr.
La mutación en el objetivo del antibiótico.	La mutación en subunidades de ARN (aminoglucósidos y macrólidos).
	La mutación en la subunidad A del ADN girasa (objetivos de las quinolonas).
Cambio en la acumulación del antibiótico dentro de la bacteria.	Bombas de expulsión que bombean antibióticos al exterior de la célula bacteriana.
	La pérdida de porinas (canales dentro de la membrana bacteriana).

Tomado de: L. Saiman *Paediatric Respiratory Reviews* 2007; 8(3): 249-255.

#### 4.4 Factores asociados a la adquisición de *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* es rara vez un miembro de la flora microbiana normal en seres humanos. Las tasas de colonización representativas para sitios específicos en los seres humanos son de 0 a 2% para la piel, de 0 a 3,3% para la mucosa nasal, de 0 a 6,6% para la garganta, y 2,6 a 24% para las muestras fecales (92). Sin embargo, las tasas de colonización pueden superar el 50% durante la hospitalización, especialmente entre los pacientes que han sufrido un trauma o una brecha en las barreras cutáneas o mucosas durante la ventilación mecánica, traqueostomía, catéteres, cirugías o quemaduras graves. Los pacientes con alteraciones de la inmunidad tienen un mayor riesgo para la colonización por este organismo, y la alteración en la flora microbiana normal como resultado de la terapia antimicrobiana también se ha demostrado que aumenta la colonización por *P. aeruginosa* (93).

A pesar de la amplia distribución de *P. aeruginosa* en la naturaleza y el potencial de las infecciones adquiridas en la comunidad, las infecciones graves por *P. aeruginosa* son en su mayoría adquiridas en el hospital. Cuando tratamos de identificar los factores específicos para la adquisición de *P. aeruginosa* uno de los factores más determinantes son las comorbilidades asociadas al paciente tales como la existencia de una enfermedad crónica de base, inmunodepresión como sucede en los pacientes trasplantados y/o neoplasias, enfermedades pulmonares como las bronquiectasias, fibrosis quística y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (94). El hallazgo de *Pseudomonas aeruginosa* con morfotipo mucoso es característico de la infección crónica tanto en los pacientes con EPOC, bronquiectasias ó FQ. Cuando este tipo de *P. aeruginosa* emerge presenta mayor tasa de mutación, menos movilidad y mayor propensión a generar biopelículas.

En el caso de *P. aeruginosa* se ha comprobado un patrón de colonización crónico por una misma cepa. El estado de alta densidad de células bacterianas es comunicado por las bacterias por moléculas específicas (*quórum-sensing*) que controlan la formación del biofilm y algunos de los factores de virulencia. Además, este alto inóculo en un nicho donde se producen modificaciones en la presión de oxígeno y deprivación de nutrientes favorece la selección de mutantes resistentes sobretodo en las cepas hipermutantes. La hipermutación es un fenómeno demostrado en las poblaciones de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con FQ, EPOC y bronquiectasias que facilita los fenómenos de adaptación a situaciones adversas medioambientales y también el desarrollo de resistencia (95).

Otro de los factores de riesgo sumamente importante es la naturaleza del propio agente infeccioso, los mecanismos de resistencia y, la susceptibilidad antibiótica varía no solo de un área geográfica a otra sino también en diferentes sectores del mismo hospital. Por todo esto, es fundamental conocer los factores de riesgos propios de cada centro y, los mecanismos de resistencia implicados que determinan el perfil de antibiograma predominante en cada uno de ellos, para de esa manera tener los datos precisos a la hora de tomar las medidas más eficaces individualizando las decisiones según las características epidemiológicas de cada unidad.



## II. HIPÓTESIS

Aunque la infección por *Pseudomonas aeruginosa*. es en gran parte responsable de la progresión de la enfermedad pulmonar en la fibrosis quística, la relación entre los factores relacionados con su adquisición y transformación en cepas resistentes y multirresistentes es aún poco conocida.

Nuestro estudio “Epidemiología de la infección respiratoria por *Pseudomonas aeruginosa* resistente y multirresistente en pacientes con fibrosis quística” tiene como objetivo ahondar en el conocimiento de estos factores, de forma que nos permita identificar lo más precozmente posible a aquellos pacientes más susceptibles, tanto de colonizarse crónicamente como de evolucionar hacia una infección por cepas de *P. aeruginosa* con una mayor resistencia antibiótica y, por consiguiente, con un peor pronóstico a corto y medio plazo.

Tiene un enorme interés el conocer la evolución temporal de las tasas de resistencia frente a los diferentes antibióticos antipseudomónicos, con el fin de determinar el régimen de tratamiento antibiótico más eficaz en nuestra cohorte de pacientes con FQ.

Un mayor conocimiento de la cronología desde la primera adquisición de *P. aeruginosa*, hasta su cronicidad y transformación en un fenotipo mucóide, nos va a permitir delimitar con exactitud el “periodo ventana” del que disponemos para intentar retrasar la cronificación mediante un tratamiento antibiótico precoz y agresivo.



### III. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis fue profundizar en el conocimiento de diferentes aspectos epidemiológicos de la colonización/infección por *P. aeruginosa* en la cohorte de pacientes con FQ del País Vasco.

#### **Objetivo primario:**

Determinar la prevalencia de la colonización/infección por *P. aeruginosa* e investigar los factores asociados al desarrollo de la infección crónica por éste microorganismo.

#### **Objetivos secundarios:**

1. Evaluar la cronología de la colonización/infección por *P. aeruginosa* y el desarrollo de los diferentes morfotipos en el tiempo.
2. Estudiar la evolución temporal de la sensibilidad antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa* a lo largo del periodo del estudio longitudinal.
3. Evaluar el impacto clínico de la infección pulmonar por cepas de *P. aeruginosa* resistentes y multirresistentes.
4. Determinar la capacidad diagnóstica de las precipitinas séricas frente a *P. aeruginosa* para diferenciar la situación de colonización intermitente versus infección crónica por éste patógeno, así como su utilidad para discriminar qué pacientes están en riesgo de fallecer o precisar de un trasplante pulmonar.
5. Estudiar la correlación del nivel de precipitinas con el estatus nutricional (IMC), la situación en la función respiratoria (FEV<sub>1</sub>% y FVC%) y la severidad de las lesiones radiológicas (“Score de Bhalla” en la TAC).



## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Población de estudio.**

Este estudio fue una revisión clínica de los datos demográficos, clínicos y microbiológicos de la cohorte de pacientes con FQ del País Vasco durante el periodo 1996-2014. Nuestra Unidad atiende a todos los pacientes con un diagnóstico de FQ del País Vasco y otras Comunidades como Navarra, Cantabria y Castilla-León. Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían un diagnóstico confirmado de FQ según los criterios establecidos (24).

Todos los datos se obtuvieron mediante la revisión de las historias clínicas y los registros microbiológicos del laboratorio de microbiología del Hospital Universitario de Cruces. Bizkaia. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Cruces. Cada paciente o su representante legal otorgaron un consentimiento firmado para su inclusión en el estudio.

El número de pacientes atendidos en la Unidad de FQ durante el periodo de estudio fue de 250. Durante el seguimiento los pacientes tuvieron la siguiente evolución: fallecieron 27 pacientes; 20 fueron perdidos al seguimiento y 15 trasplantados (8 en seguimiento/7 perdidos). En total fueron excluidos 54 pacientes. En el año 2014, período en el que realizamos el estudio epidemiológico transversal, entraron en el estudio un total de 196 pacientes.

### **2. Datos demográficos, clínicos y microbiológicos de los pacientes**

#### **2.1 Datos demográficos y clínicos.**

Se obtuvieron de los registros clínicos e historias electrónicas de nuestros pacientes durante el periodo 1996-2014.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes que se registraron fueron: edad, sexo, edad al diagnóstico, estudio genético, test de sudor, estatus pancreático,

índice de masa corporal (IMC), capacidad vital forzada (FVC%) y el volumen espirado forzado en el primer segundo en porcentaje del valor predicho (FEV<sub>1</sub>%).

La función pulmonar, medida a través del porcentaje del valor predicho del FEV<sub>1</sub> y FVC, el índice de masa corporal (IMC) y las muestras respiratorias de esputo o exudado faríngeo se registraron en el momento de su inclusión en el estudio.

Las exacerbaciones respiratorias registradas lo fueron de acuerdo con los criterios establecidos por Fuchs y cols. (96) y el número de ingresos hospitalarios y los días de hospitalización se documentaron de los registros hospitalarios durante los 5 años previos a su inclusión en el estudio.

También recogimos los datos demográficos y clínicos de los pacientes trasplantados y fallecidos al tiempo del evento, y los comparamos con los mismos datos de los pacientes en seguimiento activo.

## **2.2 Datos microbiológicos.**

Todos los estudios microbiológicos se obtuvieron del registro del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Cruces. Se recogieron durante el periodo 1996-2014, el estado de colonización frente a *P. aeruginosa* para determinar la prevalencia anual de la colonización por esta bacteria. En el año 2014, año del estudio transversal, establecimos el estado de colonización patogénica de toda la cohorte frente a los diferentes microorganismos: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), *Burkholderia cepacia* complex (BCC), *Achromobacter xylosoxidans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus influenzae*; así como el estado de colonización por hongos de las especies *Aspergillus* spp, *Candida* spp. y *Scedosporium* spp.

La sensibilidad antimicrobiana en los pacientes con colonización por *P. aeruginosa* se evaluó frente a los distintos antibióticos antipseudomónicos: piperacilina-tazobactam, carbapenems, cefalosporinas antipseudomonas, aztreonam, aminoglucósidos y colistina.

Se estableció el estado de colonización/infección frente a *P. aeruginosa* según los criterios de Leeds (97): i) *libre* de *P. aeruginosa* (0 cultivos positivos); ii) *intermitentemente* colonizado (< 50% de cultivos positivos); y iii) *crónicamente* colonizado ( $\geq$ 50% de los cultivos positivos).

De los 196 pacientes en seguimiento activo en el año 2014, 89 pacientes tenían una colonización/infección por *P. aeruginosa*. Identificamos retrospectivamente la primocolonización por esta bacteria, el inicio de la infección crónica y el momento de la conversión de *P. aeruginosa* planctónica a su fenotipo mucoide.

El estado de colonización/infección por *P. aeruginosa* se correlacionó con el nivel de anticuerpos séricos precipitantes (precipitinas), frente a los antígenos capsulares de las cepas de *P. aeruginosa*, para determinar la potencia discriminatoria de este marcador biológico en diferenciar entre los diferentes estados de colonización: colonización intermitente, colonización crónica y ausencia de colonización por *P. aeruginosa* acorde a los criterios microbiológicos.

De los pacientes trasplantados y fallecidos durante el periodo de estudio, fueron analizados sus datos demográficos, clínicos y microbiológicos. Estos datos se correlacionaron con los niveles de anticuerpos precipitantes frente a *P. aeruginosa* para determinar el valor pronóstico de este biomarcador.

### **3. Cultivo microbiológico e identificación de los aislados.**

Se procesaron para cultivo las muestras de esputo o exudado faríngeo de los pacientes atendidos en la Unidad de FQ de nuestro hospital durante el año 2014. Las muestras de esputo se procesaron siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología (98). El protocolo comprende la homogenización y fluidificación previa al cultivo con ditiotreitól. Posteriormente se sembró la muestra para cultivo bacteriano cuantitativo en los siguientes medios de cultivo: agar sangre de carnero, agar chocolate, agar sal-manitol, agar McConkey, medio cepacia y agar Sabouraud gentamicina-cloranfenicol (Becton, Dickinson and

Company, New Jersey, EEUU) y se incubaron aeróbicamente a 37°C hasta 72 horas. Las placas de agar chocolate se incubaron en anaerobiosis. Las muestras de exudado faríngeo se inocularon directamente en los mismos medios de cultivo.

Tras incubar las placas, se seleccionaron las colonias morfológicamente compatibles con patógenos relevantes en pacientes con FQ y se realizó el recuento del número de unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra (UFC/ml). Las técnicas de identificación de los patógenos utilizadas durante el periodo 1996-2013 incluyeron pruebas bioquímicas, galerías de identificación API (bioMérieux, Francia) y microscopía con azul de lactofenol (para hongos filamentosos). A partir de 2014 se utilizó además la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik, Alemania). Algunas cepas del complejo *Burkholderia cepacia* fueron identificadas mediante el análisis de la secuencia del gen *recA* (99) en el Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid).

Se seleccionaron visualmente los diferentes morfotipos de *P. aeruginosa* en los que se clasifican habitualmente las colonias (metálica, puntiforme, rugosa, mucosa) para posteriores estudios. Todas las cepas se guardaron congeladas a -70° C en leche semidesnatada hasta el momento de su estudio.

#### **4. Estudios de sensibilidad antibiótica.**

Las pruebas de sensibilidad antibiótica o antibiograma definen la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado e indican la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de una población bacteriana. La determinación de sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos de los microorganismos estudiados se realizó en el periodo 1996-2014 por diferentes métodos: un método de microdilución en caldo automatizado y métodos de difusión en agar (E-test y disco-placa).

En el año 2014 se determinó la sensibilidad antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa* mediante microdilución en caldo y E-test. En los casos de cepas con problemas de

crecimiento, aspecto mucoso o elevada heterogeneidad se utilizaron E-test y el método disco-placa.

#### **4.1 Método de microdilución en caldo.**

La microdilución en caldo es uno de los métodos de referencia para la determinación cuantitativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a un determinado antibiótico y consiste en una determinación visual del crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de antibiótico. El inóculo se preparó a partir de suspensiones 0,5 en la escala de McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) que fue diluido 1:1000 en caldo Mueller Hinton para alcanzar una concentración final de  $10^4$ - $10^5$  UFC/ml. Se emplearon sistemas semiautomáticos de inoculación-lectura e interpretación: sistema VITEK 2 (bioMérieux, Francia) hasta 2013 y posteriormente el sistema MicroScan WalkAway 96 plus (Beckman Coulter, EEUU). Los paneles fueron incubados durante 18-20 horas a 37°C y el valor de CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado.

Los antibióticos empleados fueron piperacilina/tazobactam, imipenem, meropenem, aztreonam, ciprofloxacino, levofloxacino, ceftazidima, cefepima, gentamicina, tobramicina, amikacina y colistina. Para todos los antimicrobianos se consideraron los puntos de corte recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (M100-S10, 2010) (100).

#### **4.2 Método disco-placa.**

El antibiograma disco-placa, basado en la técnica de Kirby-Bauer (101), consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. El disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde

radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI.

#### **4.3. Método del Epsilon test (E-test).**

Se trata de una técnica para la determinación cuantitativa del valor de CMI que utiliza una tira de plástico impregnada de antibiótico con un rango de concentración creciente y variable según el agente antimicrobiano. La tira se deposita en una placa de agar inoculada con una suspensión bacteriana 0,5 en una escala McFarland en suero fisiológico. El valor de CMI corresponde al valor que aparece en el punto de intersección del halo de inhibición de crecimiento bacteriano de forma elipsoidal. Este procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (AB BIODISK, Solma, Suecia).

En este trabajo se utilizaron tiras de Etest® de ciprofloxacino, tobramicina, imipenem y ceftazidima. Las placas fueron incubadas durante 18-24 horas a 37°C y se procedió a la lectura según las recomendaciones del fabricante.

#### **4.4 Definición de multirresistencia en *Pseudomonas aeruginosa*.**

Los criterios de sensibilidad antibiótica fueron los recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (100). Teniendo en cuenta el estado de resistencia frente a los diferentes antipseudomónicos, las cepas de *P. aeruginosa* fueron clasificadas como: sensibles, cuando mostraban resistencia a menos de 3 antibióticos antipseudomónicos y, multirresistentes, cuando mostraban resistencia a tres o más de los antibióticos antipseudomónicos (87).

## 5. Determinación de precipitinas frente a *P. aeruginosa*.

Un aspecto crucial en la atención de los pacientes con FQ es la detección temprana de la colonización por *P. aeruginosa* para iniciar precozmente un tratamiento erradicador (102). Desde este punto de vista, el lavado broncoalveolar o los cultivos de esputo espontáneos o inducidos obtenidos a intervalos regulares serían los métodos deseables para la detección microbiológica de *P. aeruginosa* (103). Sin embargo, en la práctica clínica a menudo tenemos que depender de los resultados de los cultivos de frotis orofaríngeos porque los pacientes son demasiado jóvenes o no pueden expectorar, y este método es la única técnica directa no invasiva y fácilmente disponible para obtener cultivos de las secreciones respiratorias.

Un enfoque alternativo es rastrear la colonización de *P. aeruginosa* mediante las pruebas de anticuerpos en suero contra este patógeno, que permite detectar al microorganismo antes incluso de que se aíse en las muestras respiratorias (104).

### 5.1. Sujetos y diseño del estudio.

Desde el año 1985, a todos nuestros pacientes con FQ de la Unidad, se les realiza una determinación anual de anticuerpos séricos precipitantes, precipitinas, frente a antígenos capsulares de *P. aeruginosa* y *S. aureus* en el Departamento de Microbiología Clínica y Centro de Fibrosis Quística Danés. Rigshospitalet, University of Copenhagen dirigido por el Dr. Neils Høiby.

Anualmente se obtiene de cada paciente una muestra de 2,5 mililitros de suero que se congela y envía para su análisis. Los resultados del análisis mediante inmunoelectroforesis cruzada se expresan con un número entero de anticuerpos precipitantes, precipitinas, hallados en la muestra. Los valores de 0 y 1 se consideran negativos; valores de 2 o más precipitinas se consideran a priori positivos para el microorganismo testado.

Todos los pacientes con FQ fueron testados de forma sistemática para estos dos microorganismos, o para cualquier otro microorganismo que se hubiese identificado

en los meses previos en las muestras de esputo, como *H influenzae*, BCC, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bordetella bronchiseptica*, etc. Los resultados de la prueba de precipitinas se cotejaron con los datos microbiológicos obtenidos de las muestras de esputo o exudados faríngeos.

En lo que respecta a poder determinar el valor discriminante de las precipitinas en relación al estado de colonización por *P. aeruginosa*, los resultados de las pruebas de anticuerpos precipitantes se correlacionaron en primer lugar, con los datos microbiológicos conocidos a partir de la inclusión de cada paciente en la cohorte FQ. También evaluamos la correlación del nivel de precipitinas con los parámetros clínicos de los pacientes, IMC, FEV<sub>1</sub> % y FVC% predicho, número de exacerbaciones pulmonares y número de ingresos hospitalarios. Además, analizamos la evolución del nivel de precipitinas en los años previos al evento, de aquellos pacientes que precisaron de un trasplante pulmonar o fallecieron.

## **5.2 La inmunolectroforesis cruzada.**

La determinación de precipitinas se llevó a cabo mediante la técnica de inmunolectroforesis cruzada (CIE) como ha sido descrita (105). Se depositaron sobre portas de cristal de 5X5 cm, 2 ml de una preparación de antígenos polivalente de *P. aeruginosa* (St-Ag: 1-17), consistente en volúmenes iguales de antígenos solubles en agua de los 17, O serogrupos de *P. aeruginosa* (O-1 al O-17), y fueron expuestos frente al suero del paciente en un gel de Agarosa, con un pH 8,6. Después de teñir con colorante azul brillante, se cuantificó el número de inmunoprecipitados. Cada precipitado representó un anticuerpo contra un antígeno específico de *P. aeruginosa*. Se consideraron como normales los valores de 0-1 precipitados (68).

## 6. Análisis estadístico.

Estadística descriptiva:

Las variables categóricas se describen utilizando las frecuencias absolutas o relativas. Las variables continuas utilizando la media y la desviación estándar cuando se cumplen criterios de normalidad en la distribución de los datos y utilizando la mediana, los percentiles 25 y 75 y el rango cuando no se cumplen.

Estadística inferencial:

Los contrastes de hipótesis sobre comparación de variables continuas entre 2 grupos se han realizado utilizando el test de la T de Student para muestras independientes o el test U de Mann-Whitney en función de la normalidad en la distribución de los datos. La comparación entre tres o más grupos utilizando Análisis de la Varianza (ANOVA) o el test de Kruskal-Wallis en función de los mismos criterios.

Las asociaciones entre variables continuas se han llevado a cabo utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. La normalidad en la distribución de cada variable se ha valorado mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Las asociaciones entre variables categóricas se han testado utilizando el test de Ji cuadrado o el test exacto de Fisher en función de las frecuencias esperadas en las tablas de contingencia. La sensibilidad (proporción de verdaderos positivos) y especificidad (proporción de verdaderos negativos) se han calculado a partir de las tablas de contingencia. Los intervalos de confianza del 95% utilizando el método exacto descrito por Clopper-Pearson (106).

Para el análisis de la asociación entre la colonización crónica por *Pseudomonas aeruginosa* y los potenciales factores de riesgo, se ha ajustado un modelo de regresión logística binaria a los datos. La selección de variables se ha realizado de forma manual, comenzando con un modelo completo con todos los predictores y utilizando de forma secuencial contrastes de eliminación de factores no significativos utilizando el test de la razón de verosimilitud (likelihood ratio test) para comparar modelos. Se ha

explorado la existencia de interacciones entre predictores a partir de la construcción de los correspondientes productos de covariables. Para las variables continuas se ha evaluado la linealidad de la asociación en el “modelo logit” creando variables polinómicas y testando su significación en el modelo. Se ha evaluado la bondad del ajuste global del modelo final utilizando tests de su linealidad global en el logit, el test de Hosmer-Lemeshow (107) y una exploración de los residuos y casos influyentes. La capacidad discriminativa se valoró calculando la sensibilidad y especificidad para distintos puntos de corte y a través del área bajo la curva ROC. La interpretación del grado y sentido de la asociación se ha estimado utilizando los “odds ratios” y sus intervalos de confianza al 95%. Finalmente para facilitar la interpretación de los resultados se han utilizado las probabilidades marginales estimadas a partir del modelo final.

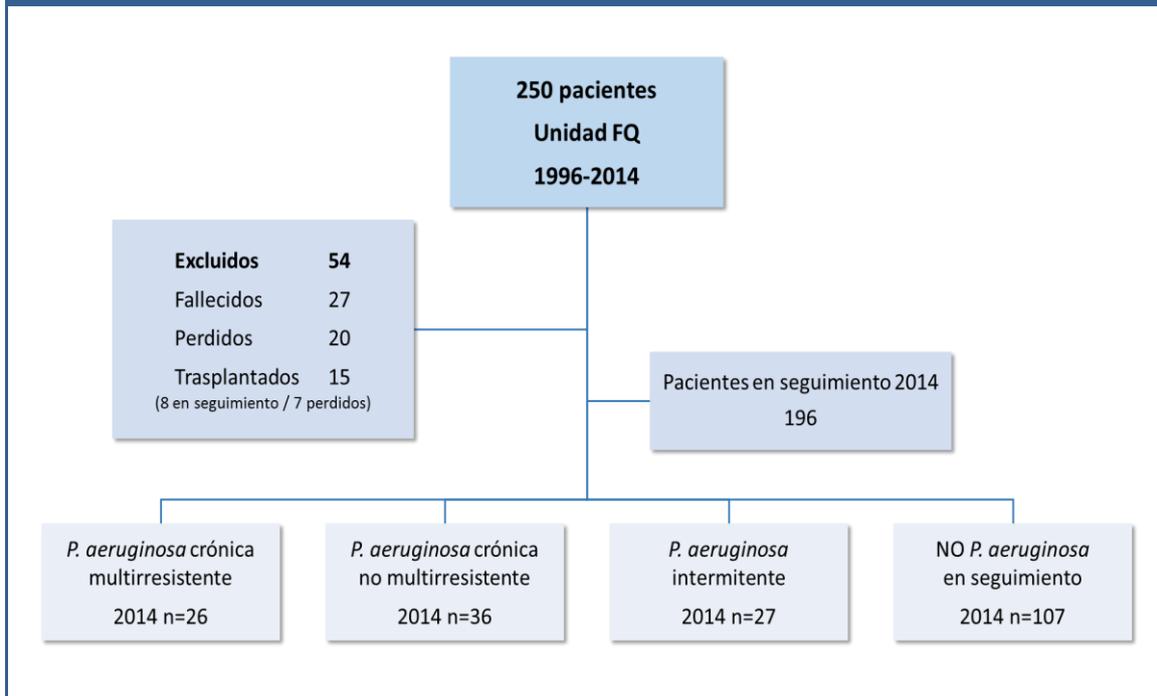
El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software estadístico Stata versión 14.2 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP). En todos los casos la significación estadística fue definida por un valor  $p \leq 0,05$ . No se han realizado ajustes por comparaciones múltiples.

## V. RESULTADOS

### 1. Características de la población estudiada.

La evolución de la cohorte de pacientes con FQ del País Vasco, atendida durante el periodo 1996-2014, se muestra en la figura 1.

Figura 1. Diagrama de flujo cohorte pacientes FQ del País Vasco (1996-2014)



Durante los 19 años de seguimiento, fueron atendidos un total de 250 pacientes. Durante el evolutivo, 27 pacientes fallecieron, 15 precisaron de un trasplante pulmonar (8 de ellos en seguimiento activo y 7 perdidos al seguimiento); 20 pacientes adicionales fueron perdidos al seguimiento.

Para el análisis del estudio transversal del año 2014, 54 pacientes fueron excluidos, siendo objeto del estudio clínico, demográfico y microbiológico un total de 196 pacientes, con una edad media de 22,9 años; 82 mujeres (42,2%) y 114 varones (57,8%). Las características demográficas y clínicas más relevantes se muestran en la Tabla 1.

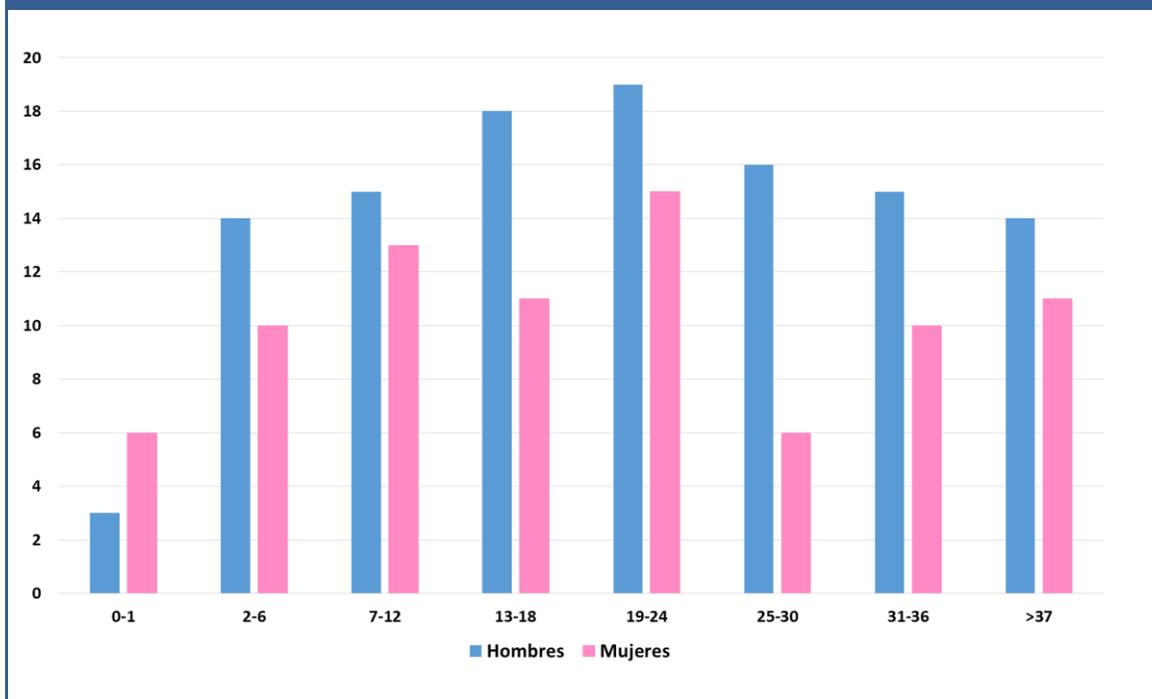
Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes

<b>Número pacientes: 196</b>	Varones, nº (%)	114	(57,8)
<b>Edad (años)</b>	Media (DE)	22,9	(13)
	Rango	0-63	
<b>Edad al diagnóstico (años)</b>	Media (DE)	5,4	(10)
	Rango	0-63	
<b>Genética</b>	Homocigotos F508del, nº (%)	72	(36,7)
	Heterocigotos F508del, nº (%)	85	(43,3)
	Otra/otra, nº (%)	39	(20)
<b>Test del sudor mmol/L , media (DE)</b>		<b>92</b>	<b>(19,5)</b>
<b>Insuficiencia pancreática, nº (%)</b>		<b>168</b>	<b>(86)</b>
<b>IMC, media (DE)</b>		<b>20</b>	<b>(3,7)</b>
<b>FEV<sub>1</sub> (%), media (DE)</b>		<b>78</b>	<b>(24)</b>
<b>FVC (%), media (DE)</b>		<b>91</b>	<b>(16)</b>

IMC: Índice de masa corporal  
 FEV<sub>1</sub>: Volumen espirado forzado en el primer segundo  
 FVC: Capacidad vital forzada

Las mutaciones del gen CFTR, se identificaron en el 98% de los pacientes. La mutación más frecuentemente detectada en los alelos fue la mutación F508del, identificada en 229 alelos; en 72 (36,7%) de los pacientes en forma homocigota y en 85 (43,3%) en forma heterocigota. La distribución por edad y sexo de nuestra cohorte se muestra en la Figura 2. Un total de 90 (46%) de los pacientes se situaba en el rango de edad de entre 0 y 17 años; la población adulta  $\geq 18$  años era de 106 (54%) pacientes.

Figura 2. Distribución de los pacientes por género y edad



## 2. Patrones de colonización/infección.

Durante el año 2014, momento del estudio transversal, se obtuvieron 307 cultivos positivos para patógenos bacterianos de la fibrosis quística en 167 pacientes (85,2%), en 126 de estos se trataba de una infección crónica; en 29 pacientes (14,8%) no se obtuvo aislamiento bacteriano alguno. En 90 (46%) pacientes se identificó más de un microorganismo en los cultivos de las secreciones respiratorias. La prevalencia de los diferentes patógenos asociados a la FQ se muestra en la Tabla 2.

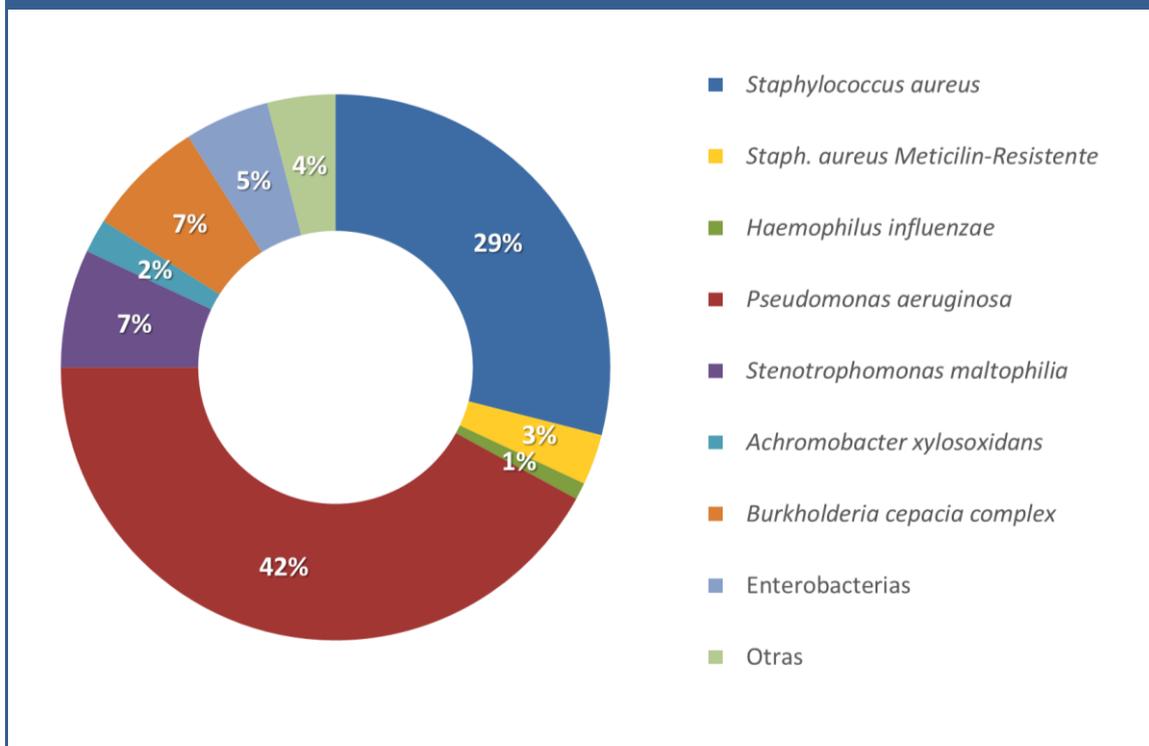
Tabla 2. Prevalencia microorganismos bacterianos en la población FQ (2014)

<b>TOTAL PACIENTES</b>	<b>250</b>		
Total en seguimiento 2014	196		
Pacientes con cultivos positivos	167		
Pacientes infección crónica	126		
No aislamientos	29		
Computo total patógenos	307		
<b>AISLAMIENTOS</b>	<b>Total</b>	<b>Aislamientos (%)</b>	<b>Pacientes (%) Aislamientos</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	89	29	45,4
<i>Staph. aureus Meticilin-Resistente</i>	10	3,2	5,1
<i>Haemophilus influenzae</i>	3	0,9	1,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78	25,4	39,8
<i>Pseudomonas aeruginosa (mucoide)</i>	51	16,6	26,0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21	6,8	10,7
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	5	1,7	2,6
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	21	6,8	10,7
Enterobacterias	16	5,2	8,2
Otras BGNNF	13	4,2	6,6
Total	307	100	

BGNNF: bacilos gram negativos no fermentadores

La distribución porcentual de los patógenos bacterianos en nuestra población FQ en seguimiento activo en el año del estudio transversal, se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Prevalencia de aislamientos bacterianos en la FQ (2014)



*P. aeruginosa* con un 42% de los aislamientos y *S. aureus* con un 29% fueron los patógenos aislados más frecuentemente. Se observó una mayor prevalencia de *S. aureus* en la población con FQ de entre 0-21 años, mientras que la prevalencia de *P. aeruginosa* fue máxima en los pacientes adultos de entre 21-35 años (Figura 4).

Otros BGNNF como *S. maltophilia* y *A. xylosoxidans* se aislaron en el 6,8% y 1,6% respectivamente sin un claro predominio en ningún segmento de edad.

Los aislamientos por el complejo BCC fueron del 6,8%, el 80 % de las cepas se aislaron en pacientes adultos mayores de 18 años. La identificación de los distintos genomovares fue inicialmente mediante cultivo en medios selectivos y, posteriormente confirmados genéticamente en el laboratorio de referencia del

Instituto de Salud Carlos III de Madrid. Del total de las cepas BCC identificadas en 19 pacientes, *B. multivorans* y *B. contaminans* se aislaron en 8 y 5 paciente respectivamente, siendo las especies identificadas con mayor frecuencia.

*Stafilococcus aureus* meticilin resistente (SAMR), fue aislado en 10 (5,1%) pacientes. La edad media de estos pacientes era de  $22,5 \pm 4,6$  años. Existía una coinfeccion por *P. aeruginosa* en 6 de estos pacientes.

Una colonización fúngica se identificó en 77 (39,3%) pacientes, principalmente a expensas de los hongos filamentosos *Aspergillus* spp. en 59 pacientes y, en menor medida por *Scedosporium* spp. en 12 pacientes. Hubo un claro predominio de aislados por hongos en la población adulta de entre 18 y 35 años de edad (Figura 5).

Los aislados por hongos se produjeron como un patógeno asociado a diferentes especies de bacterias, principalmente en pacientes infectados por *P. aeruginosa* en 47 (24%) y *S. aureus* en 30 (15,3%).

Figura 4. Prevalencia de los microorganismos por segmentos de edad (2014)

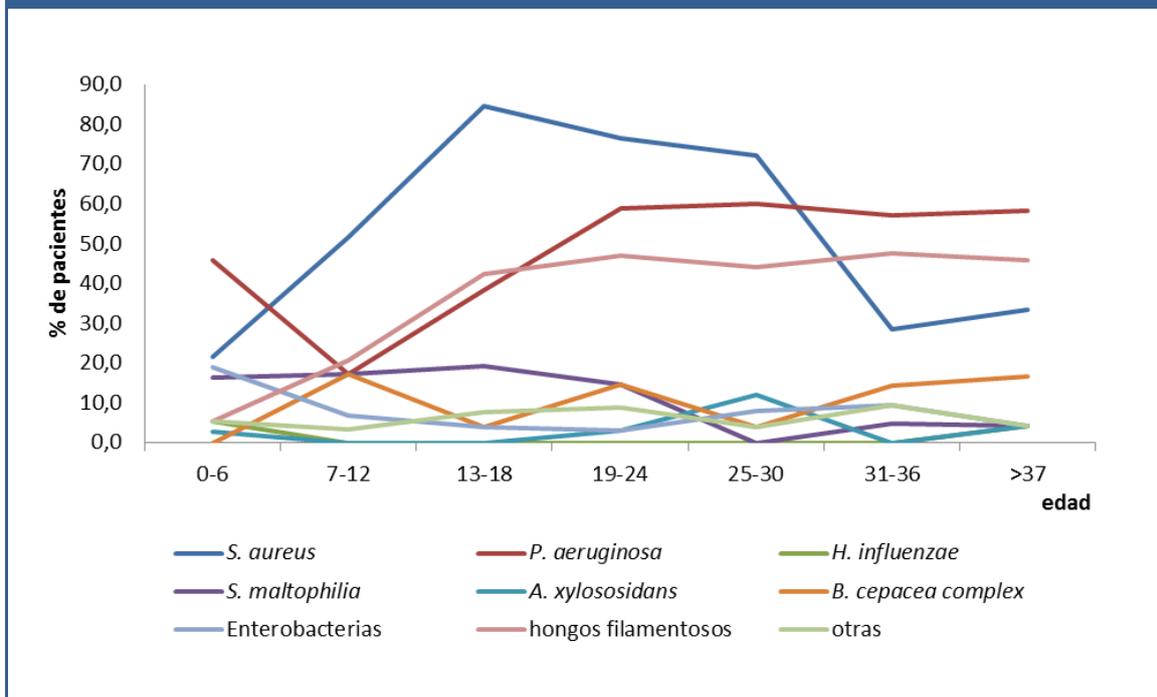
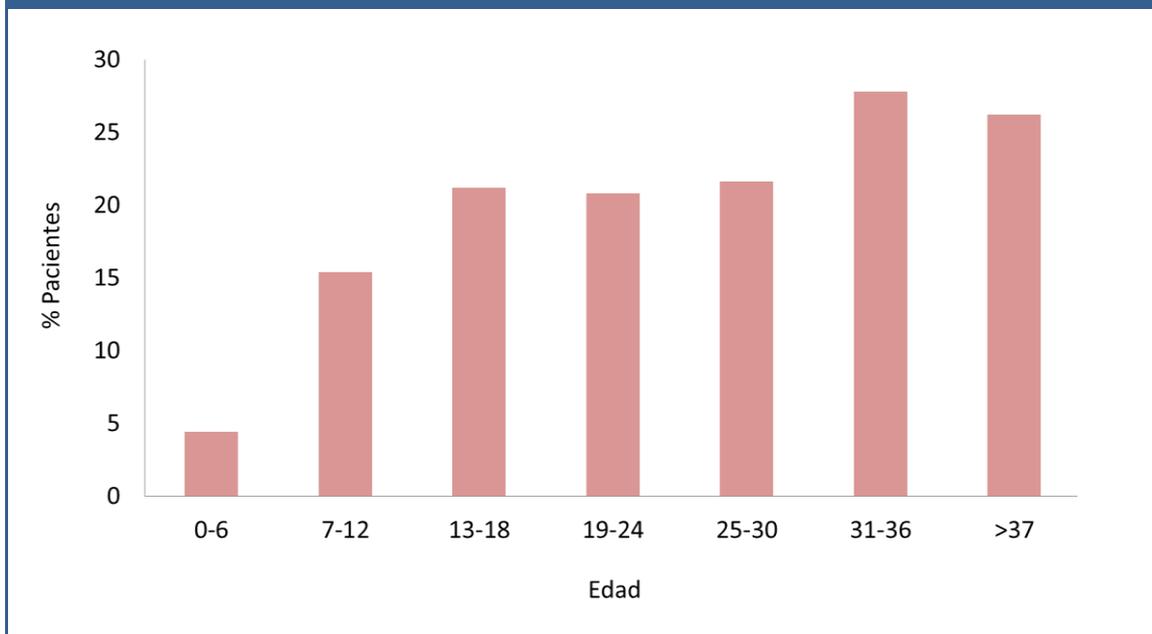
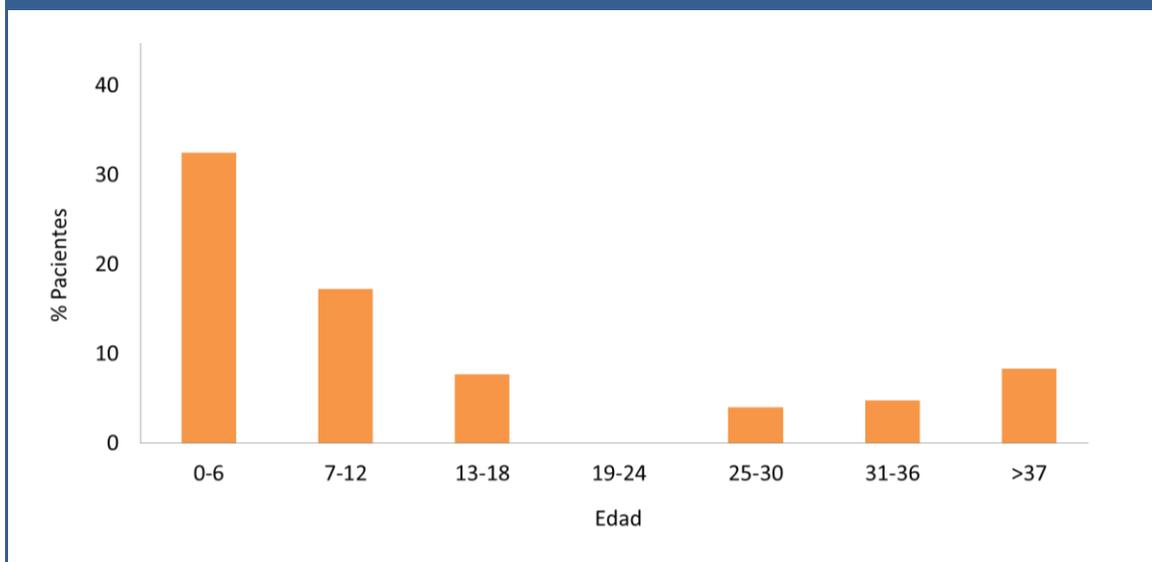


Figura 5. Prevalencia de los hongos filamentosos por grupos de edad



Durante el año del estudio transversal, en 29 pacientes no se obtuvo ningún aislamiento microbiológico. Como se aprecia en la Figura 6, esta ausencia de aislados ocurrió mayoritariamente en las edades extremas de la cohorte.

Figura 6. Pacientes sin aislamientos bacterianos por grupos de edad



Otro aspecto que se comparó, fue la distribución de los microorganismos por segmentos de edad (Figura 7).

*S. aureus* fue el microorganismo con mayor prevalencia en los pacientes pediátricos y alcanzó una prevalencia máxima del 84,4% a los 13 años de edad; posteriormente declinó su número de aislamientos a medida que aumentaba la edad de los pacientes, si bien, se mantuvo en cifras por encima del 30% en la población adulta mayoritariamente como colonizador múltiple asociado a otros microorganismos.

La colonización por *P. aeruginosa* aumentó progresivamente desde cifras de prevalencia del 10% a los 5 años, hasta alcanzar un pico máximo del 60,5% a los 19 años, manteniéndose en estas cifras de prevalencia en todos los grupos de pacientes a partir de ésta edad. Un dato sorprendente fue la tasa tan alta de aislados de *P. aeruginosa* del 40,5% en los pacientes de entre 0-6 años, si bien se comprobó que se trataba de colonizaciones intermitentes.

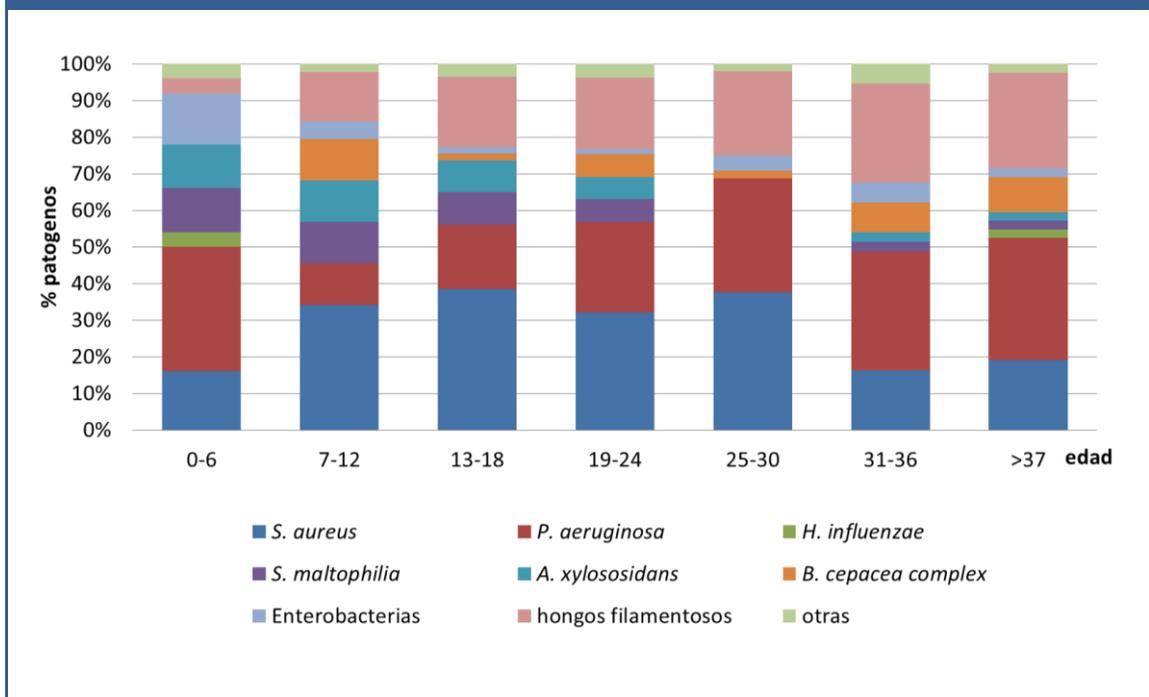
El complejo BCC, se aisló en 19 pacientes (10,7%), apareciendo los primeros aislamientos a partir de los 7 años de edad, y su distribución era muy heterogénea entre los distintos grupos de edad. Las especies aisladas fueron: *B. multivorans* (8), *B. contaminans* (5), *B. cepacia* (3), *B. stabilis* (2), *B. vietnamiensis* (2), *B. arboris* (1).

En todos los pacientes colonizados /infectados por cepas de BCC, esta especie estaba asociada a otro microorganismos. En 7 casos asociada a *P. aeruginosa*, en 6 a *S. aureus* y en 8 a *Aspergillus* spp. La coinfección de la cepas de BCC con cepas de *P. aeruginosa*, se produjo mayoritariamente con cepas de *P. aeruginosa* mutirresistentes.

Es notorio que especies de *H. influenzae* se aislasen únicamente en 3 ocasiones a lo largo del año 2014, lo que representa el 1% de los aislamientos bacterianos.

Los hongos filamentosos, especialmente *Aspergillus* spp, fueron aumentando su prevalencia de forma paulatina desde la infancia, alcanzando su techo máximo a los 30 años de edad, con una prevalencia como patógeno asociado de entre el 30% al 35% de los aislados a partir de esa edad. También se aislaron especies de *Scedosporium prolificans* y *apiospermium* en 7 y 5 aislados respectivamente.

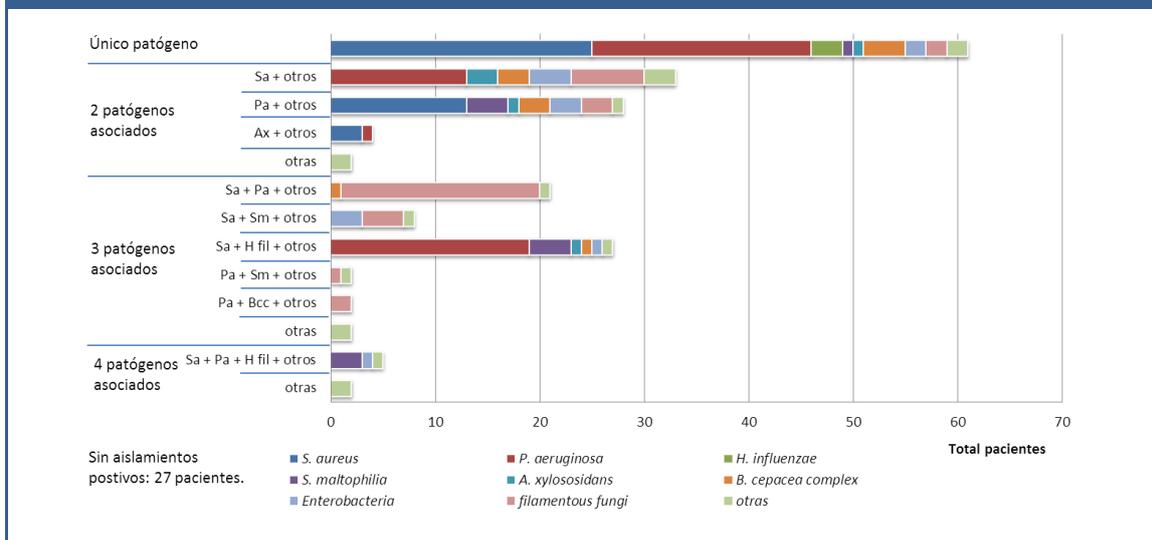
Figura 7. Distribución de los patógenos en los diferentes grupos de edad



### 2.1 Patrones de colonización múltiple.

La coexistencia de varios microorganismos es un hecho muy frecuente en los pacientes con fibrosis quística. En nuestra cohorte, un total de 61 (31%) de nuestros pacientes tuvo un único patógeno en el cultivo, predominando como aislamiento único *S. aureus* en 25 casos y *P. aeruginosa* en 21 casos. La coinfección de dos patógenos, se observó en el 32,2 % de los pacientes, siendo las colonizaciones múltiples más frecuentes los hallazgos en un mismo cultivo de *S. aureus* y otro patógeno en 33 (16,8%) pacientes y la coinfección de *P. aeruginosa* y otra bacteria en 28 (14,4 %) pacientes. También se observó una colonización múltiple de tres microorganismos en 29 (14,8%) pacientes (Figura 8).

Figura 8. Patrones de colonización múltiple en la cohorte FQ



## 2.2 Patrones de colonización múltiple en pacientes con *P. aeruginosa*.

Los hallazgos de colonización múltiple en los pacientes infectados por *P. aeruginosa*, variaron en función del estado de colonización, con porcentajes del 51,8% y 61,5% para los pacientes con colonización intermitente y crónica por *P. aeruginosa* respectivamente (Figuras 9 y 10).

Figura 9. Patrón de coinfección en pacientes con *P. aeruginosa* intermitente

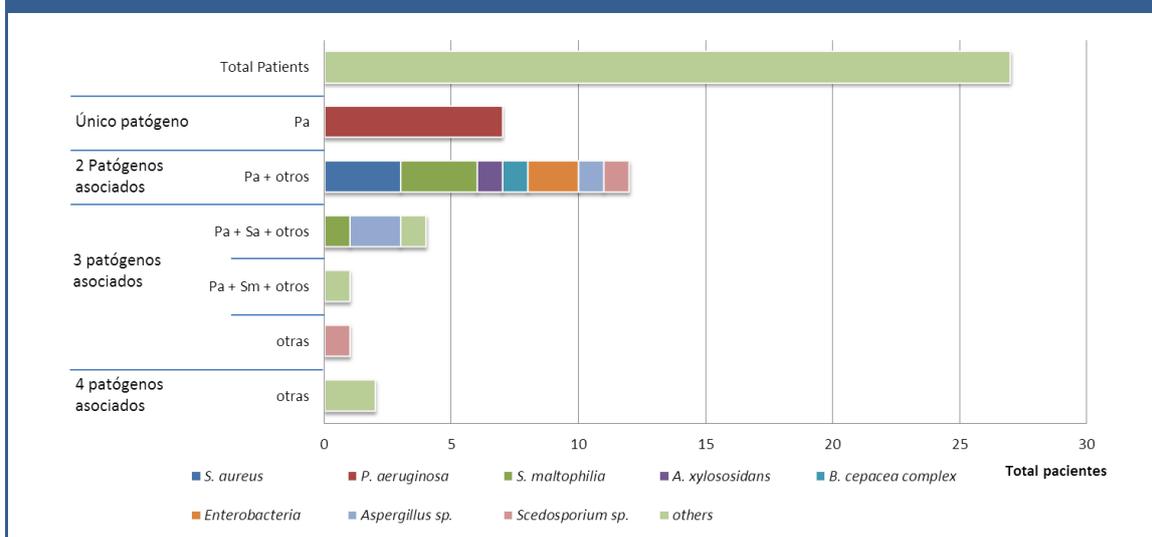
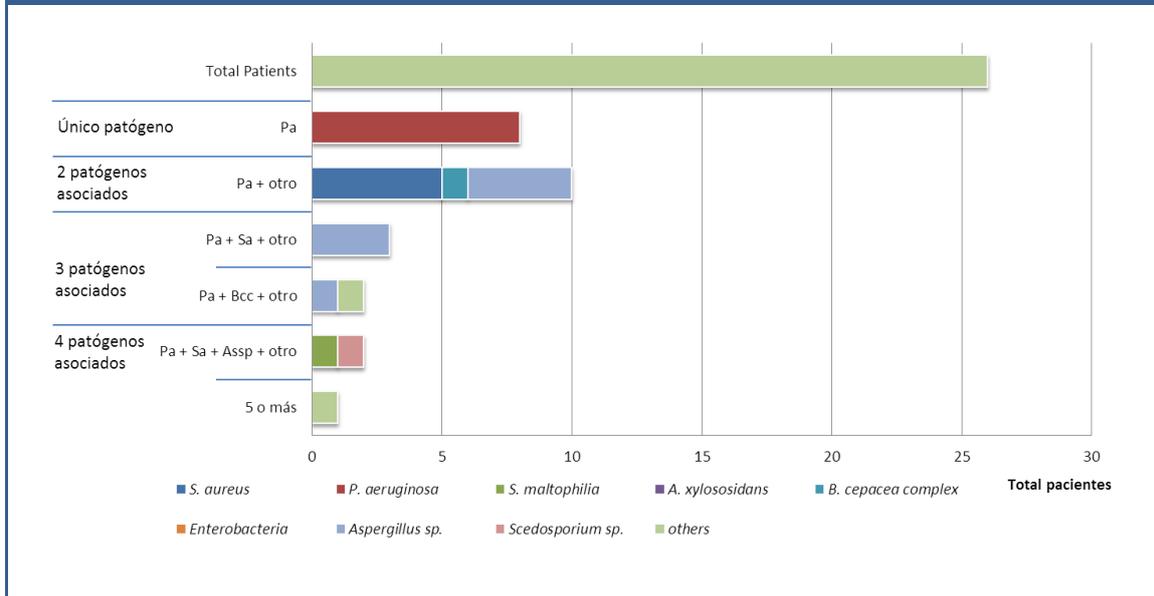


Figura 10. Patrón de coinfección en pacientes con *P. aeruginosa* crónica



En los pacientes con colonización intermitente por *P. aeruginosa*, los patógenos asociados más frecuentemente fueron *S. aureus* y *S. maltophilia*.

En los pacientes con colonización crónica, los microorganismos que más frecuentemente coinfectaban la vía aérea junto a *P. aeruginosa* fueron *S. aureus* y otros BGNNF. El hongo filamentoso *A. fumigatus* se encontraba como patógeno asociado en el 30% de los pacientes con infección por *P. aeruginosa* multirresistente.

### 3. *Pseudomonas aeruginosa* en nuestra población con FQ.

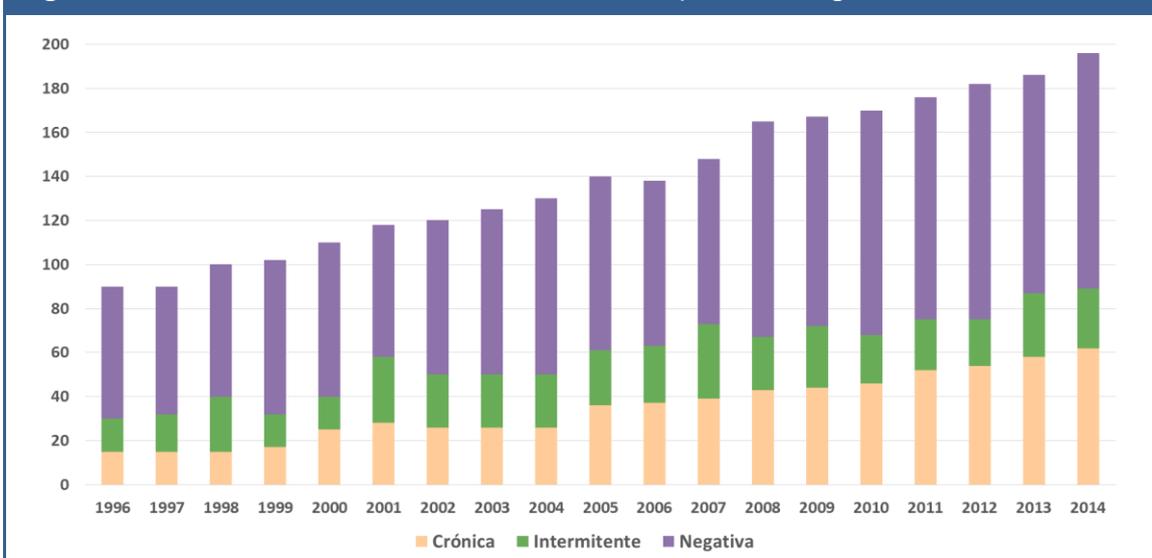
#### 3.1 Prevalencia de *P. aeruginosa* periodo 1996-2014.

Para el análisis de la colonización de los diferentes patógenos asociados a la FQ y la dinámica de la colonización/infección por *P. aeruginosa* se clasificó a los pacientes en diferentes categorías: a) no infectados, b) colonización intermitente, c) colonización/infección crónica según los criterios de Leeds (97).

En el año 1996, la cohorte de pacientes con FQ en el País Vasco contaba con 92 pacientes. En ese año la distribución real en relación a la colonización por *P. aeruginosa* era: 55 (59,8%) pacientes estaban libres de *P. aeruginosa*; 18 (19,5%) pacientes tenían una colonización intermitente y 19 (20,7%) presentaban una infección crónica por *P. aeruginosa*.

Durante los años de seguimiento, en paralelo al aumento en la población atendida, se produjo un aumento paulatino de la prevalencia de la colonización/ infección por *P. aeruginosa* hasta las siguientes cifras en el año de corte transversal (2014): 107 (54,6%); 27 (13,8%) y 62 (31,6%) de los paciente estaban libres de *P. aeruginosa*, con colonización intermitente y con colonización crónica respectivamente (Figura 11).

Figura 11. Prevalencia colonización / infección por *P. aeruginosa* (1996-2014)



### 3.2 Características de la colonización/infección por *P. aeruginosa*, año 2014.

Los pacientes con colonización intermitente por *P. aeruginosa* mostraban una edad media menor ( $10,5 \pm 8$  años) en comparación con los infectados crónicamente ( $27,8 \pm 10,3$  años)  $p < 0,001$ , que mayoritariamente se situaban en los grupo de edad comprendidos entre los 18 y los 44 años. En la población  $FQ \geq 18$  años, la prevalencia de infección crónica por *P. aeruginosa* era de 62/106 (58,5%). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con colonización intermitente vs crónica en el genotipo, test del sudor o estado de insuficiencia pancreática.

Los pacientes con colonización crónica por *P. aeruginosa*, tenían un nivel de precipitinas frente a *P. aeruginosa* significativamente más alto que los colonizados de forma intermitente y presentaban un mayor deterioro de la función respiratoria, con un  $FEV_1\%$  del predicho del 69,4% vs 83,6% en los colonizados de forma intermitente ( $p < 0,05$ ) (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los pacientes colonizados por *P. aeruginosa*

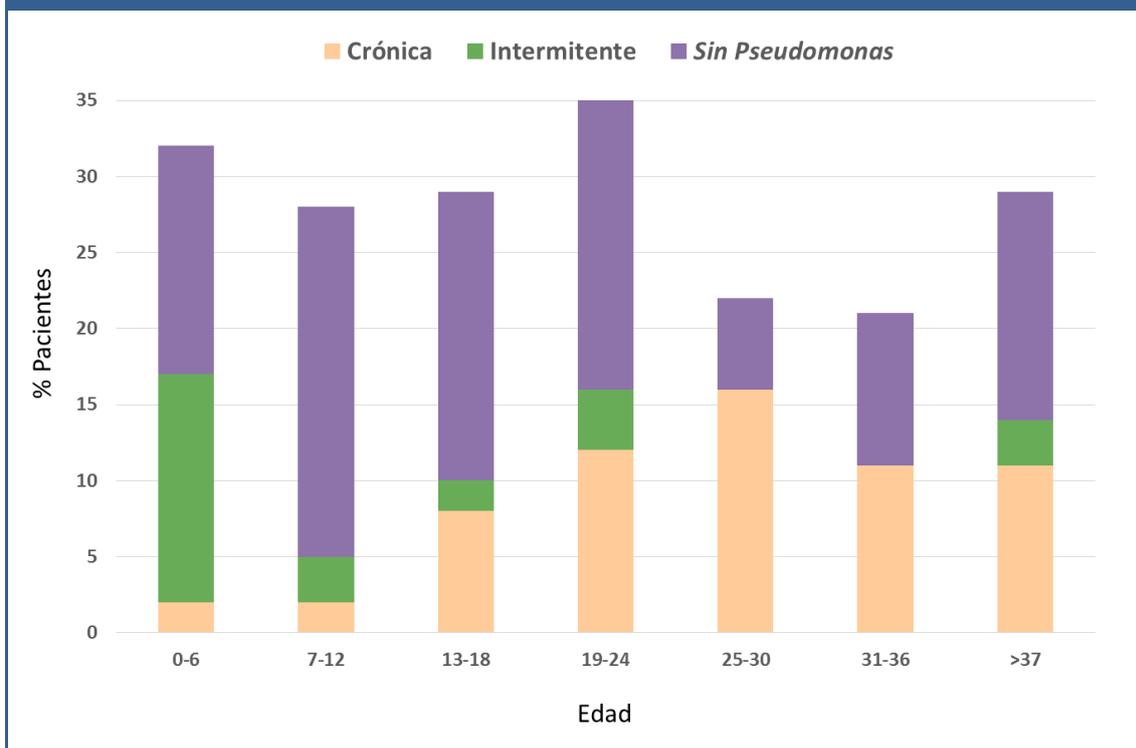
Variable	<i>P. aeruginosa</i> intermitente (n=27)	<i>P. aeruginosa</i> crónica (n=62)	Valor p	
Sexo (varón)	13 (48%)	40 (64,5%)	0,11	
Edad (años)	14 (12,8)	26,8 (10,6)	<0,001	
Genotipo	Homocigoto	13 (48%)	28 (45%)	0,67
	Heterocigoto	9 (33%)	24 (38%)	0,67
Insuficiencia pancreática	21 (77,7%)	54 (87%)	0,96	
Test sudor (mmol/L)	94 (14,6)	95 (16,5)	0,89	
Precipitinas	1,6 (2,1)	17,4 (13,1)	<0,001	
IMC	20,3 (3,5)	21,6 (3,4)	0,75	
$FEV_1\%$	83,6 (18)	69,4 (23,8)	0,053	
FVC %	88,2 (13)	87 (18,8)	0,85	

IMC: Índice de masa corporal  
 $FEV_1\%$ : Volumen espiratorio forzado en porcentaje del predicho  
 FVC%: Capacidad pulmonar en porcentaje del predicho  
 mmol/L: milimoles por litro

Cuando analizamos los resultados por grupos de edad, se comprobó que la mayoría de los pacientes no infectados se situaban en las edades más tempranas, y se colonizaban de forma crónica con el incremento en la edad de los pacientes (Figura 12).

Un análisis pormenorizado de los resultados, evidenciaba que los pacientes con colonización intermitente por *P. aeruginosa* fueron 15/27 (55%) en el grupo de edad de entre 0-6 años, y de 0/27 (0%) entre los pacientes de 25-36 años. De otro lado, la colonización crónica por *P. aeruginosa*, fue de 12/62 (19,4%) en el grupo de entre 0-18 años, y de 50/62 (80,6 %) en los pacientes adultos de  $\geq 18$  años ( $p < 0,001$ ).

Figura 12. Distribución colonización con *P. aeruginosa* por grupos de edad



### 3.3 Cronología de la infección pulmonar por *P. aeruginosa*.

La infección respiratoria por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística ha sido relacionada con un peor curso clínico a largo plazo. Sin embargo, la relación temporal entre la adquisición inicial de *P. aeruginosa*, el establecimiento de la infección bronquial crónica y la transformación de *P. aeruginosa* en un fenotipo mucóide no se conoce con precisión (102).

Durante el período de seguimiento 1996-2014, 62 pacientes desarrollaron una infección bronquial crónica por *P. aeruginosa*. La media del tiempo transcurrido desde la primera adquisición de *P. aeruginosa* hasta su cronificación fue de 4,6 años, rango (0-19). El 25% de los pacientes cumplía criterios de infección crónica el año del primer aislamiento de *P. aeruginosa*. Una vez establecida la cronicidad, el porcentaje de pacientes con cepas de fenotipo mucóide fue del 65%. La infección por *P. aeruginosa* se asoció con una caída significativa de la función pulmonar desde un FEV<sub>1</sub>% inicial, media de 82,8 ± 20,3 hasta cifras de FEV<sub>1</sub>% de 69,3 ± 19,6 (p<0.001). Los niveles de precipitinas se incrementaron de forma notoria como respuesta del sistema inmune al establecimiento de la infección crónica por *P. aeruginosa* (Tabla 4).

Tabla 4. Datos de la colonización inicial vs crónica por *P. aeruginosa*

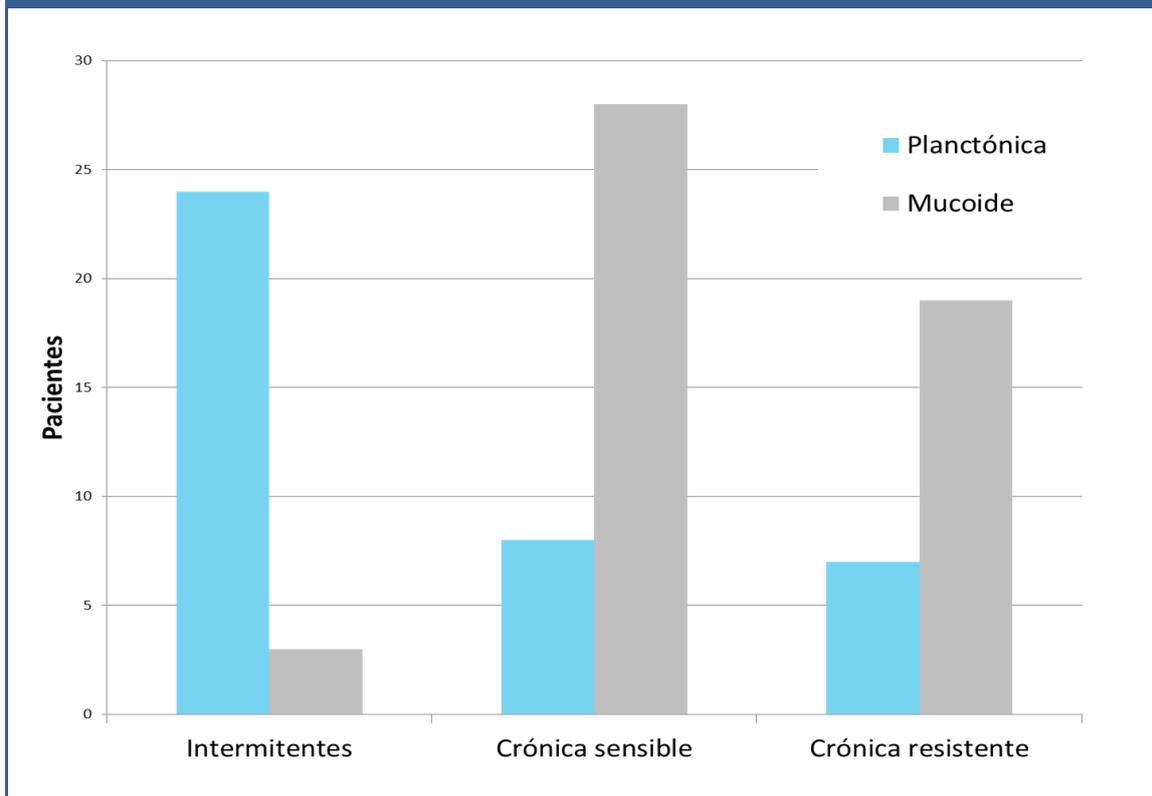
	Colonización inicial	Infección crónica	Valor p
Edad	14,5 ±9	19,1 ±9	<0,001
Precipitinas	1 (0-5)	6 (3-15)	<0,001
IMC	20,3 ±3,2	20,5 ±2,9	0,359
FEV <sub>1</sub> %	82,8 ±20,3	67,5 ±23,4	<0,001
FVC %	92,1 ±12,5	86,9 ±19,6	0,052

### 3.4 Morfotipos de los aislados de *P. aeruginosa*.

En el año del estudio de corte transversal, 89 pacientes estaban colonizados por *P. aeruginosa*, 62 de forma crónica y 27 con una colonización intermitente acorde a los criterios de Leeds (97). Se evidenció una diferencia notoria de los morfotipos de *P. aeruginosa* en relación con el estado de colonización/infección.

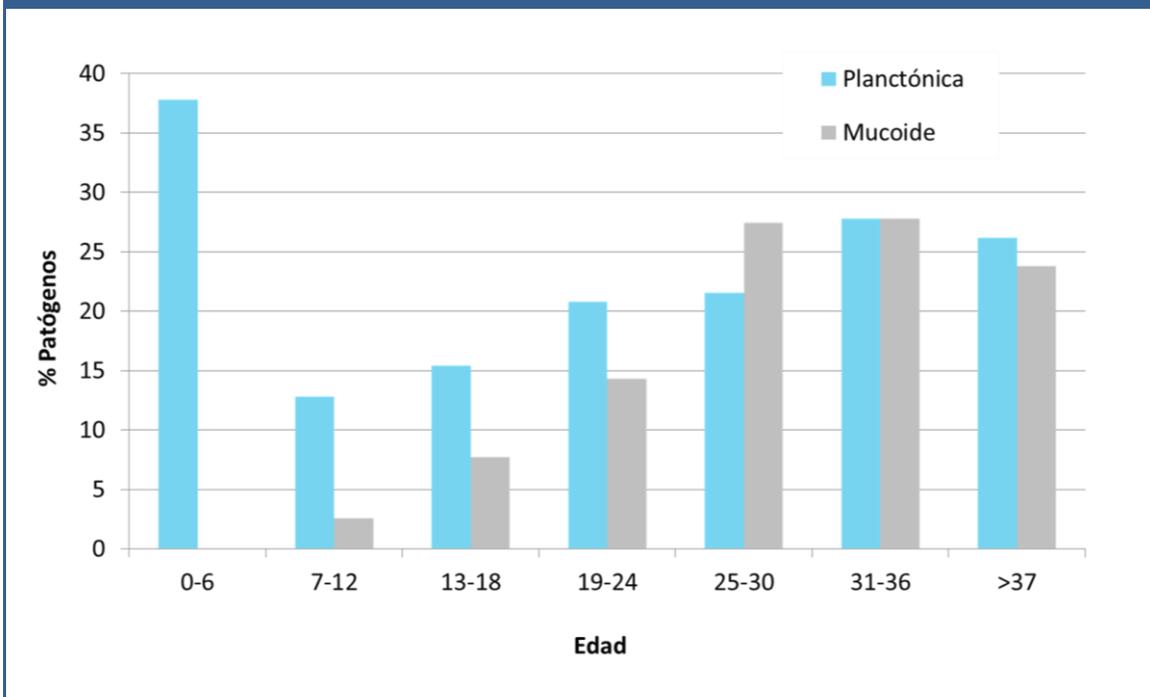
De los 27 pacientes con colonización intermitente, en 24 (89%), las cepas de *P. aeruginosa* tenían un fenotipo planctónico. En contraste con lo anterior, de los 62 pacientes con infección crónica, un 75,8% de las cepas tenían un fenotipo mucoide (Figura 13).

Figura 13. Distribución de los morfotipos de *P. aeruginosa* según colonización



La distribución de los morfotipos de *P. aeruginosa* por grupos de edad, reflejaba dos hechos relevantes. Por un lado, el aumento de la prevalencia de la colonización por *P. aeruginosa* a medida que aumentaba la edad de los pacientes, y de otro lado, cómo el fenotipo planctónico de *P. aeruginosa* daba paso al fenotipo mucoide en consonancia con el cambio del tipo de colonización, que era mayoritariamente intermitente en los pacientes más jóvenes en contraste con el tipo de infección crónica en los pacientes adultos (Figura 14).

Figura 14. Distribución de morfotipos de *P. aeruginosa* por grupos de edad



La proporción de las cepas de *P. aeruginosa* según su morfotipo, fue en nuestra cohorte del 38,5% vs 10% de morfotipos planctónico y mucoide respectivamente en los pacientes de entre 0 y 18 años; y del 61,5% vs 90% en los pacientes de  $\geq 18$  años ( $p < 0,001$ ).

### **3.5 Patrón de resistencia antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa***

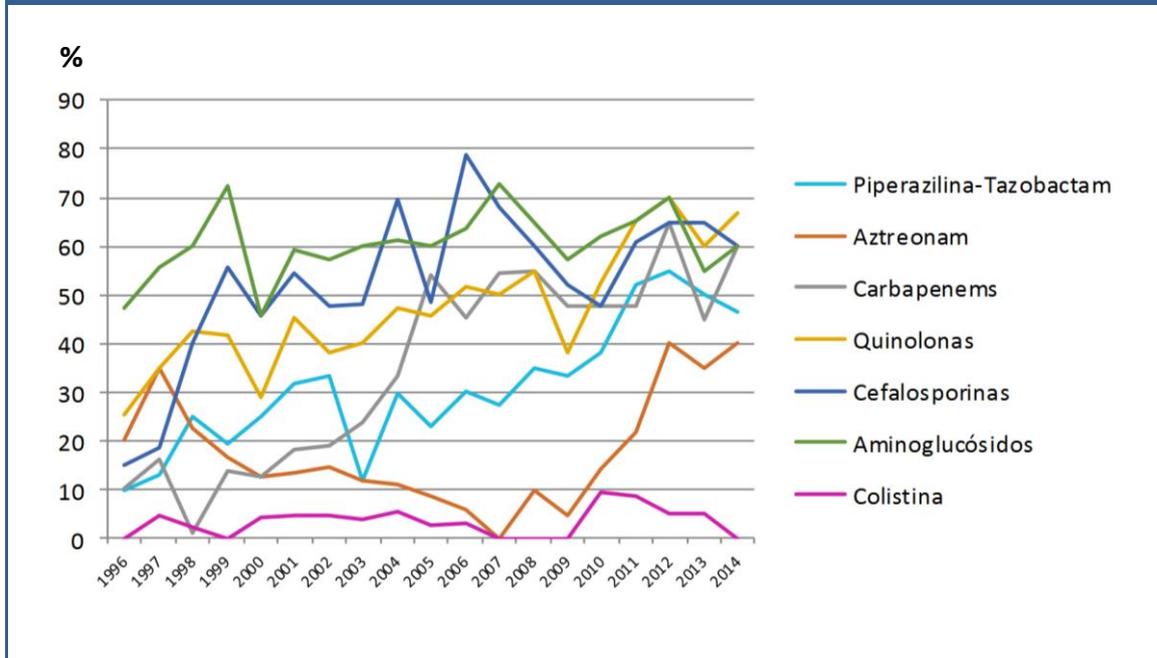
Un hecho que a día de hoy es poco conocido, son los factores asociados a la adquisición y transformación de cepas de *P. aeruginosa* sensibles a los antimicrobianos, en cepas resistentes y multirresistentes (PAMR). En nuestro estudio, las variables que se asociaban con un riesgo mayor de infección crónica por cepas de *P. aeruginosa*, fueron la colonización por *Aspergillus* spp, un genotipo homocigoto para la mutación F508del y un nivel elevado de precipitinas frente a *P. aeruginosa*.

#### **3.5.1 Patrón de sensibilidad antibiótica periodo 1996-2014.**

Una de las características que se estudiaron de las cepas de *P. aeruginosa*, fue el patrón de sensibilidad antibiótica a lo largo del periodo 1996-2014 frente a los diferentes antibióticos antipseudomónicos.

Las tasas porcentuales de resistencia antibiótica a los antipseudomónicos durante ese periodo aumentó en todos los grupos de antibióticos, siendo especialmente notoria para la piperacilina-tazobactam (10% vs 47%), aztreonam (20% vs 40%), carbapenems (11% vs 60%), quinolonas (26% vs 67%), cefalosporinas (16% vs 60%) y aminoglucósidos (48% vs 60%). Por el contrario, *P. aeruginosa* mostró tasas de resistencia a la colistina por debajo del 10% a lo largo de todo el periodo de estudio, a pesar de su uso como terapia antibiótica vía inhalada desde hace más de dos décadas en nuestra Unidad de FQ (Figura 15).

Figura 15. Resistencia antibiótica de los aislados de *P. aeruginosa* (1996-2014)



### 3.5.2 Patrón de resistencia antibiótica cepas *P. aeruginosa* 2014.

En el año 2014, se realizó el estudio transversal y analizamos la sensibilidad antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de las muestras respiratorias de nuestros pacientes durante ese año. Se testó la sensibilidad antibiótica en los 62 pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa* frente a los siguientes agentes antimicrobianos: piperacilina-tazobactam, imipenem, meropenem, aztreonam, ciprofloxacino, levofloxacino, gentamicina, amikacina, tobramicina, ceftazidima, cefepime y colistina.

Dividimos a los pacientes en dos grupos en función de la tasa de resistencia antibiótica. Grupo A) 26 pacientes colonizados por *P. aeruginosa* multirresistente, PAMR (resistente a  $\geq 3$  familias de antibióticos antipseudomónicos). Estas cepas mostraban una resistencia superior al 50% en todos los antibióticos testados, considerados individualmente, excepto a meropenem, tobramicina y colistina. Grupo B) 36 pacientes colonizados por *P. aeruginosa* no multirresistente (PAS) que registraban porcentajes

de resistencia antibiótica inferior al 20% en todos los antibióticos exceptuando amikacina (21%) y gentamicina (33%) (Figura 16).

El análisis comparativo de los porcentajes de resistencia antibiótica entre los dos subgrupos, revelaba diferencias significativas para todas los antipseudomónicos testados.

No hubo diferencias en la edad ni en el estatus nutricional entre ambos grupos, sin embargo, los pacientes infectados crónicamente por *P. aeruginosa* multirresistente (PAMR) tuvieron un deterioro mayor de la función pulmonar que los infectados por *P. aeruginosa* no multirresistente (PAS), FEV<sub>1</sub> del 58,2% vs 77,7%,  $p < 0,001$  (Tabla 5).

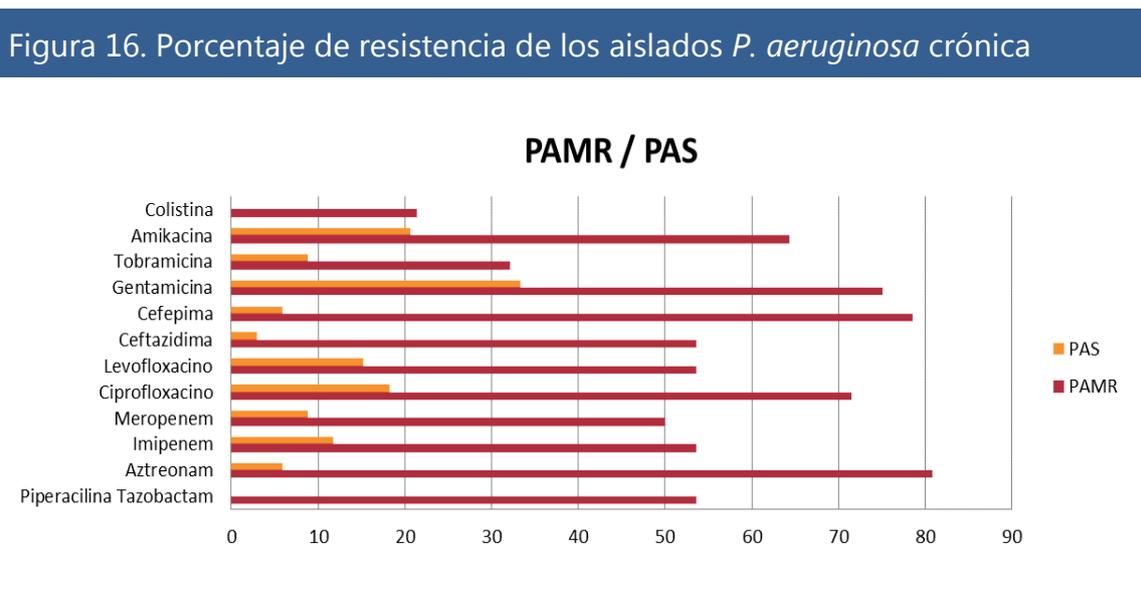


Tabla 5. Características de los pacientes infectados por *P. aeruginosa*

	PAMR	PAS	Valor p
Edad	29,2 ±11,2	25,7 ±10,1	0,204
IMC	21,3 ± 3,0	21,8 ± 3,7	0,560
FEV <sub>1</sub> %	58,2 ±22,1	77,7 ±20,9	0,001
FVC %	81,7 ± 21,9	91,0 ± 15,3	0,055

### 3.6 Factores asociados con la infección crónica por *P. aeruginosa*.

Se han descrito en la literatura diferentes factores que predisponen a la infección crónica por *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ. Factores como la edad, genotipo, sexo, comienzo temprano de la colonización inicial, estatus pancreático y deterioro de la función pulmonar (108). En cambio, existe una gran variación en los porcentajes de la colonización/infección entre diferentes cohortes, entre distintos países y dentro de un mismo país (109). Es importante conocer la epidemiología local y tratar de averiguar qué variables influyen en el desarrollo de la infección crónica por *P. aeruginosa*, pues ello tiene implicaciones clínicas.

En el año del estudio transversal, un total de 62 pacientes con una edad (media±DE) 19,1± 9,1 años; hombre /mujer 41/21, estaban infectados crónicamente por *P. aeruginosa*.

El análisis univariante, determinó como factores asociados con la infección crónica por *P. aeruginosa* en nuestra cohorte, la edad, la edad al diagnóstico, el índice de masa corporal, el FEV<sub>1</sub>%, la FVC%, el nº de ingresos hospitalarios en los 5 años previos, los niveles de precipitinas séricas, la coinfección por *Stenotrophomonas* y *Aspergillus* spp. Se incluyeron en el modelo multivariable inicial todas estas variables. Se llevó a cabo

un proceso de construcción de un modelo multivariable a partir de la eliminación progresiva de las variables con un mayor valor de p. utilizando el test de la razón de verosimilitud (likelihood ratio test). La capacidad discriminativa del modelo final se valoró calculando la sensibilidad y especificidad para distintos puntos de corte en la probabilidad estimada de colonización y a través del área bajo la curva ROC (Figura 17).

En el modelo multivariable final, tres variables permanecían asociadas significativamente a un mayor riesgo de colonización/infección crónica por *P. aeruginosa*. Ser homocigoto para la mutación F508 del frente a ser heterocigoto (OR 3,93; IC 95%: 1,03-14,98; p=0,045); la coinfección por *Aspergillus* spp. (OR 4,21; IC 95%: 1,35-13,17; p=0,013) y el nivel de precipitinas séricas frente a *P. aeruginosa* (OR 1,52 por cada incremento del nivel en una unidad; IC 95%: 1,29-1,79; p< 0,001), (Tabla 6).

Figura 17. Capacidad discriminativa del modelo de regresión

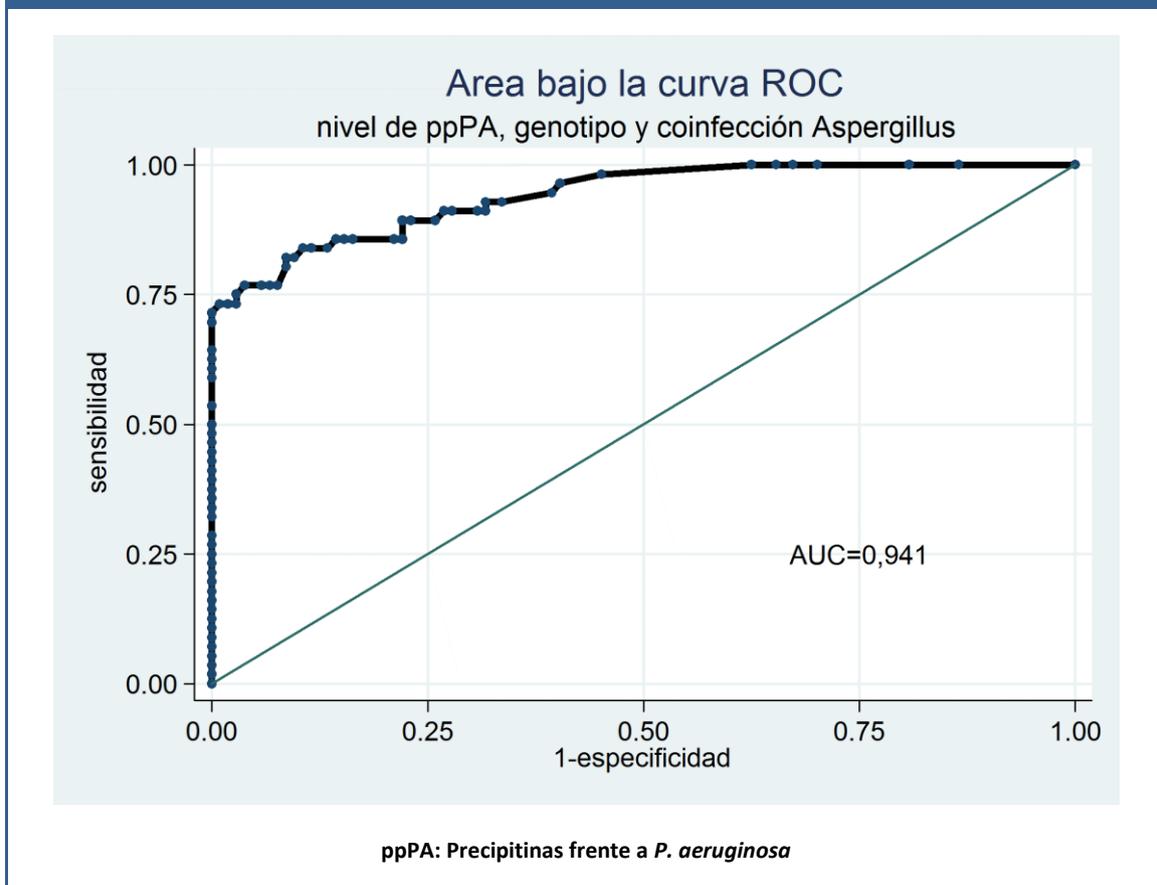


Tabla 6. Resultados del análisis multivariante

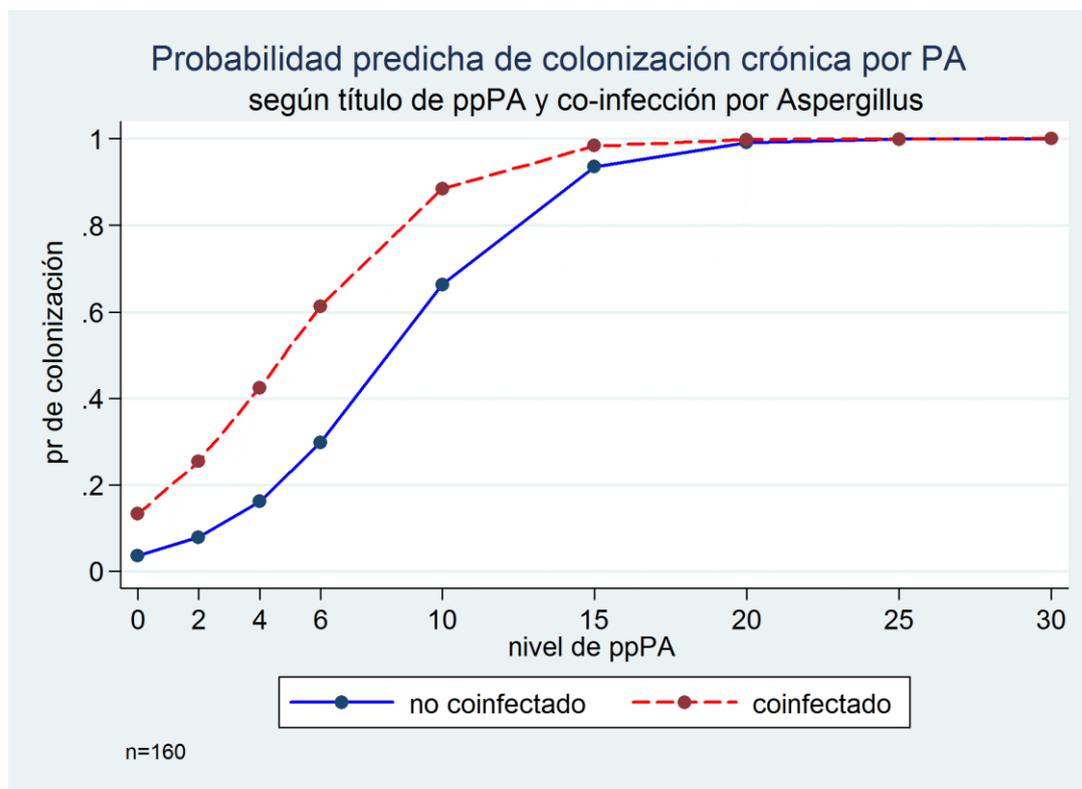
VARIABLE	OR	IC 95%	Valor p
Genotipo homocigoto*	3,93	(1,03-14,98)	0,045
Coinfección <i>Aspergillus</i> spp.	4,21	(1,35-13,17)	0,013
ppPA**	1,52	(1,29-1,79)	<0,001

\*Grupo de referencia: heterocigotos para la mutación F508del.

\*\*Asociación lineal: aumento del riesgo por unidad de incremento en el nivel sérico de precipitinas (ppPA).

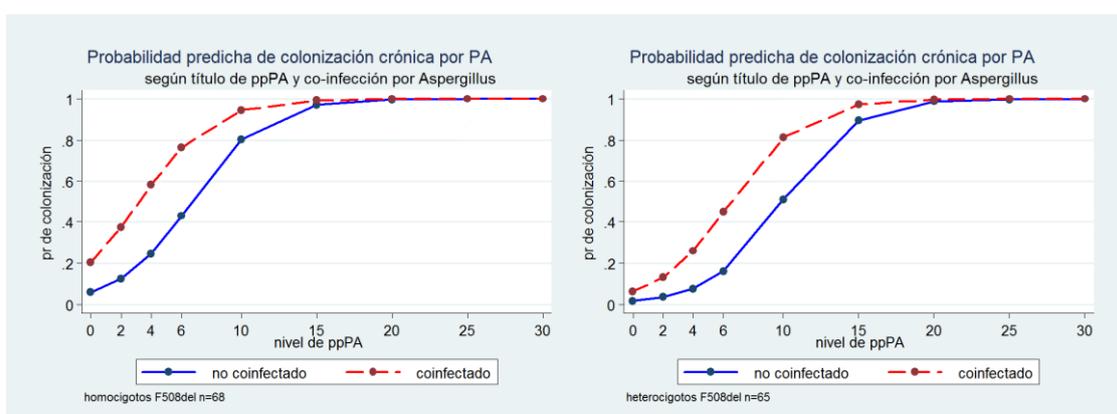
Basándonos en este modelo, en nuestra cohorte de pacientes con FQ, la probabilidad predicha de que un paciente estuviese infectado crónicamente por *P. aeruginosa* era del 65% para un nivel de precipitinas frente a *P. aeruginosa*  $\geq 10$ , y alcanzaba una probabilidad del 90% cuando se sumaba el hecho de estar coinfectado por *Aspergillus* spp. (Figura 18). Cuando introducimos en el modelo la variable ser homocigoto para la mutación F508del, la probabilidad predicha para un valor de precipitinas  $\geq 10$  era del 80% y subía al 97% cuando se añadía el estar coinfectado por *Aspergillus* spp. (Figura 19). El análisis de la colonización/infección crónica por *P. aeruginosa* observada (Figura 20), vino a corroborar lo predicho por el modelo multivariable. El nivel de precipitinas  $\geq 10$  marcaba el punto a partir del cual todos los pacientes estaban indefectiblemente infectados de forma crónica por *P. aeruginosa*.

Figura 18. Probabilidad predicha de la colonización crónica por *P. aeruginosa*



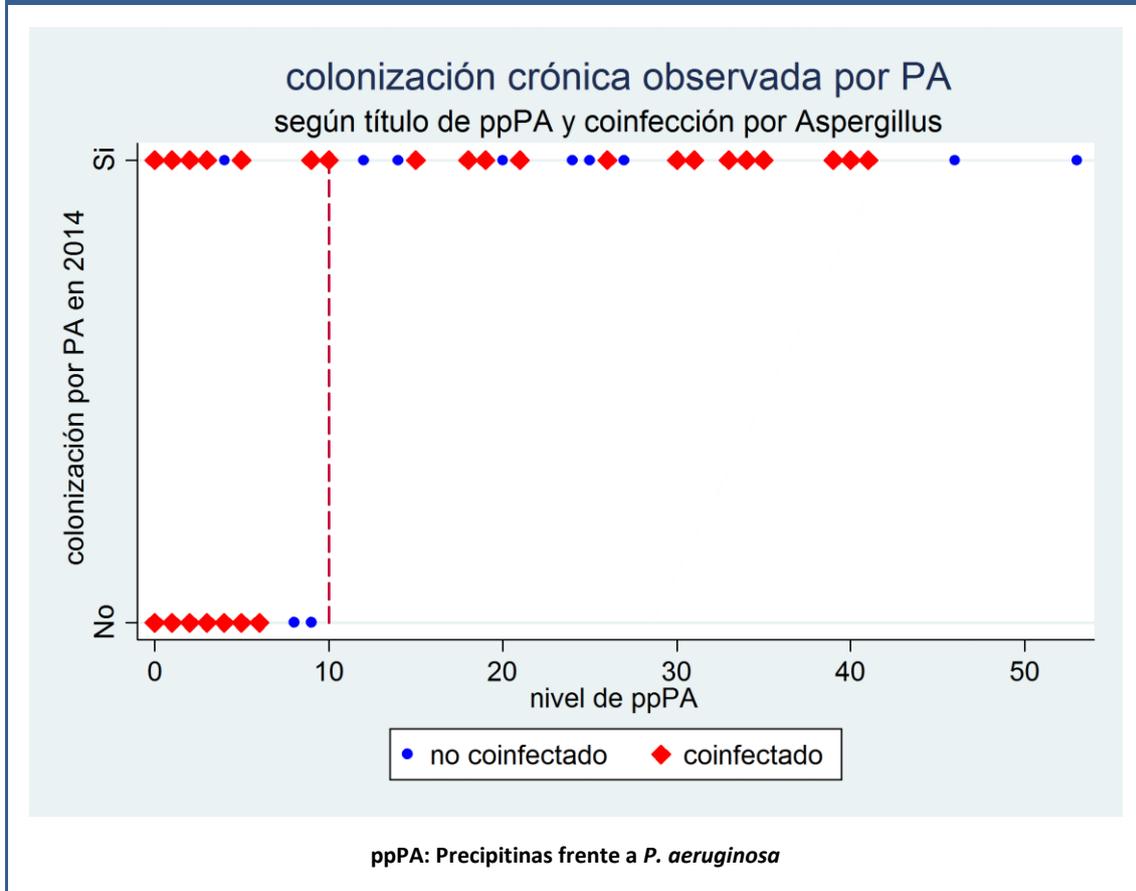
ppPA: Precipitinas frente a *P. aeruginosa*

Figura 19. Probabilidad predicha infección *P. aeruginosa*: influjo de la genética



ppPA: Precipitinas frente a *P. aeruginosa*

Figura 20. Colonización / infección crónica por *P. aeruginosa* observada



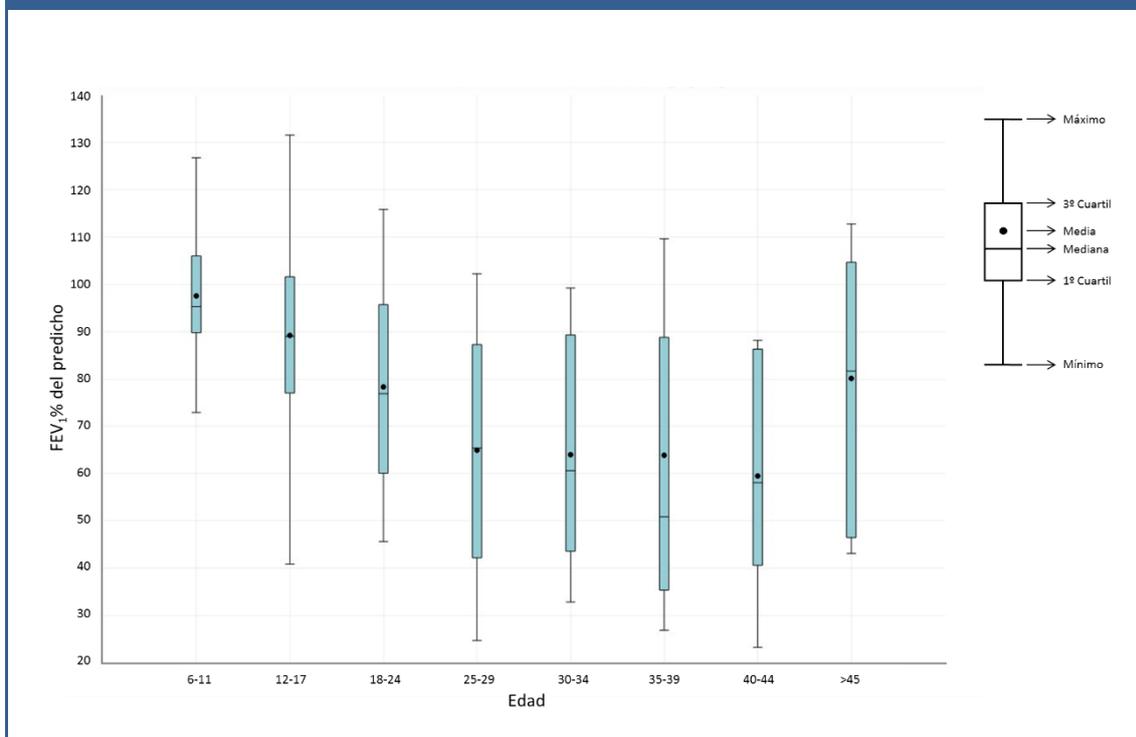
## 4. Repercusión clínica de la infección pulmonar por *P. aeruginosa*.

### 4.1 Impacto sobre la Función pulmonar.

Los resultados de la función pulmonar de nuestra cohorte en pacientes de  $\geq 6$  años, incluía 160/196 pacientes activos en el año 2014. La media del FEV<sub>1</sub>% predicho fue de 81% (DE 24,8) y de la FVC % predicha fue de 90,3 (DE 18,6).

Como era presumible, el FEV<sub>1</sub> % mostraba los valores más altos en los pacientes más jóvenes. El FEV<sub>1</sub>% medio en el tramo de edad 6-11 años fue del 97%. En los siguientes tramos de edad, el FEV<sub>1</sub>% seguía decreciendo paulatinamente con el aumento en la edad de los pacientes hasta alcanzar su valor medio más bajo, FEV<sub>1</sub> del 60% en los pacientes de entre 40-44 años. En los pacientes con  $\geq 45$  años, con un diagnóstico mayoritariamente en la edad adulta y con mutaciones del gen CFTR más leves, el FEV<sub>1</sub> medio fue del 80% del predicho (Figura 21).

Figura 21. Función pulmonar (FEV<sub>1</sub>%) cohorte FQ País Vasco (2014)



#### 4.2 Impacto sobre la Función pulmonar según estado de colonización.

Los resultados en función del estado de colonización por *P. aeruginosa* comparando entre colonizados y no colonizados, mostraba diferencias estadísticamente significativas con valores del FEV<sub>1</sub>% predicho de 88,5% versus 69,3%, p< 0,001 para los no colonizados frente a los colonizados respectivamente. La media del FVC% del predicho fue de 92,5% vs 86% para los no/si colonizados respectivamente.

Había diferencias significativas en el FEV<sub>1</sub>% entre los no colonizados y los colonizados por *P. aeruginosa* no multirresistentes (p= 0,058) y entre los no colonizados y los PAMR (p< 0,001). Un análisis en profundidad de los datos generales, evidenció que había diferencias estadísticamente significativas entre los colonizados de forma intermitente (PAI) y los colonizados por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes (PAMR), y entre los pacientes colonizados por cepas de *P. aeruginosa* sensibles (PAS) y los PAMR (Figuras 22 y 23). Se comprobó un deterioro gradual en la función pulmonar medida a través del FEV<sub>1</sub>% del predicho, desde el estado de no colonización por *P. aeruginosa* (FEV<sub>1</sub> = 88,5%), colonización intermitente (FEV<sub>1</sub> = 84,9%), colonización por cepas sensibles (PAS) (FEV<sub>1</sub> = 77,5%) y colonizados por cepas PAMR (FEV<sub>1</sub> = 58,8%).

Figura 22. Función respiratoria vs estado de la colonización por *P. aeruginosa*

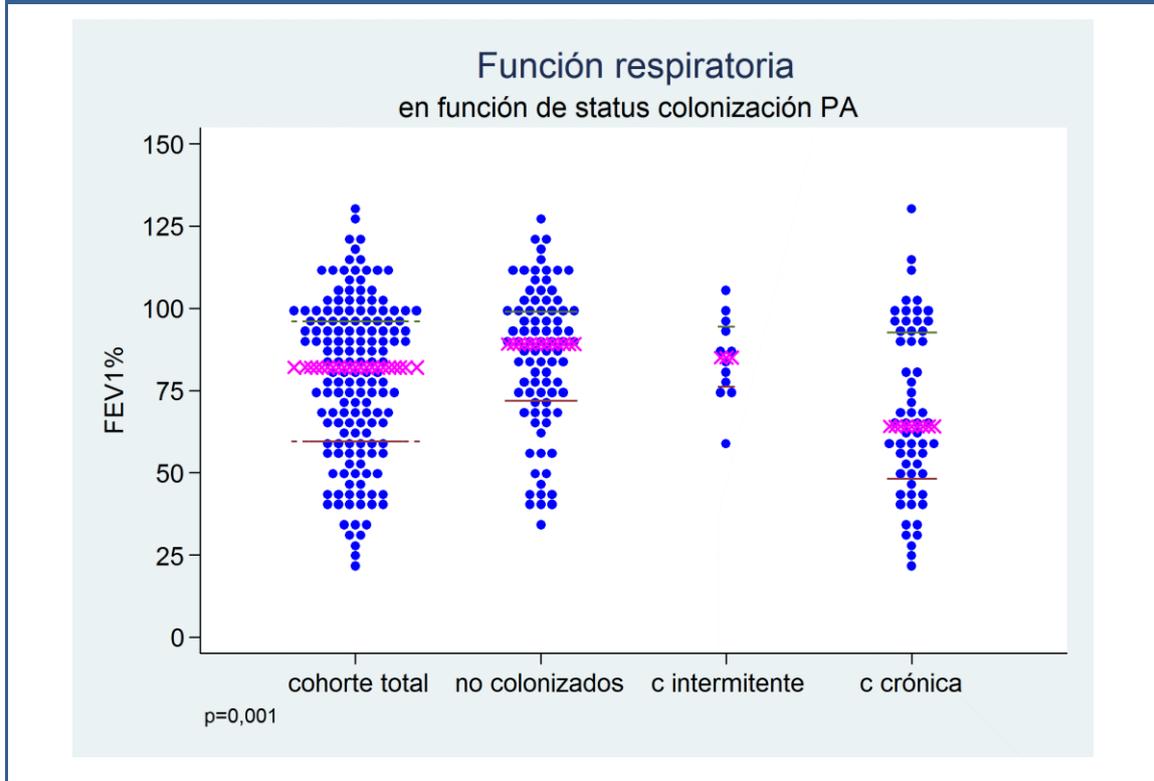


Figura 23. FEV<sub>1</sub>% vs patrón colonización / infección por *P. aeruginosa*

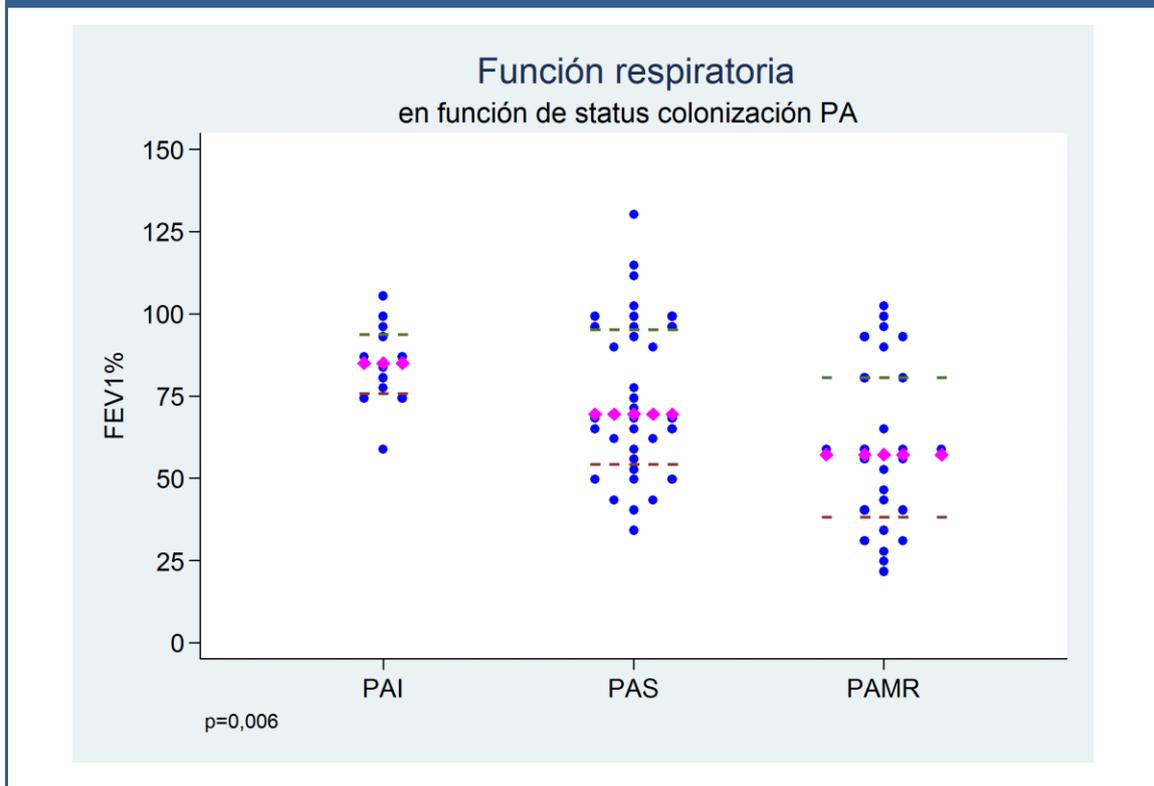




Tabla 7. Repercusión clínica de la colonización / infección por *P. aeruginosa*

	PAI (n=27)	PAS (n=36)	PAMR (n=26)	Valor p
Nº exacerbaciones, media (rango)	0,46 (0-9)	0,76 (0-4)	2,23 (0-8)	<0,001
Nº ingresos hospitalarios, media (rango)	0,15 (0-1)	0,21 (0-2)	1,15 (0-5)	0,003
Nº días de ingreso, media (rango)	0,78 (0-15)	2,00 (0-37)	8,81 (0-55)	0,001

El estatus clínico de los pacientes infectados crónicamente por *P. aeruginosa* mostraba diferencias significativas en relación al nivel de resistencia antibiótica de la cepas de *P. aeruginosa*. Los pacientes infectados por cepas multirresistentes tuvieron un mayor deterioro funcional (FEV<sub>1</sub>%), mayor número de exacerbaciones infecciosas pulmonares, más ingresos hospitalarios y días de ingreso en el hospital que aquellos pacientes infectados por cepas de *P. aeruginosa* sensibles (Tabla 8).

Tabla 8. Características pacientes infectados por *P. aeruginosa* (PAMR vs PAS)

	PAMR	PAS	Valor p
IMC, media (DE)	21,3 (3,0)	21,8 (3,7)	0,560
FEV <sub>1</sub> %, media (DE)	58,2 (23,1)	77,7 (20,9)	0,001
FVC% ,media (DE)	81,7 (21,9)	91,0 (15,3)	0,055
Nº exacerbaciones, mediana (p25-p75)	1 (0-4)	0 (0-1)	0,006*
Nº de ingresos, mediana (p25-p75; rango)	0 (0-2; 0-5)	0 (0-0; 0-11)	0,014*
Nº días de ingreso, mediana (p25-p75; rango)	0 (0-10; 0-55)	0 (0-0; 0-228)	0,009*

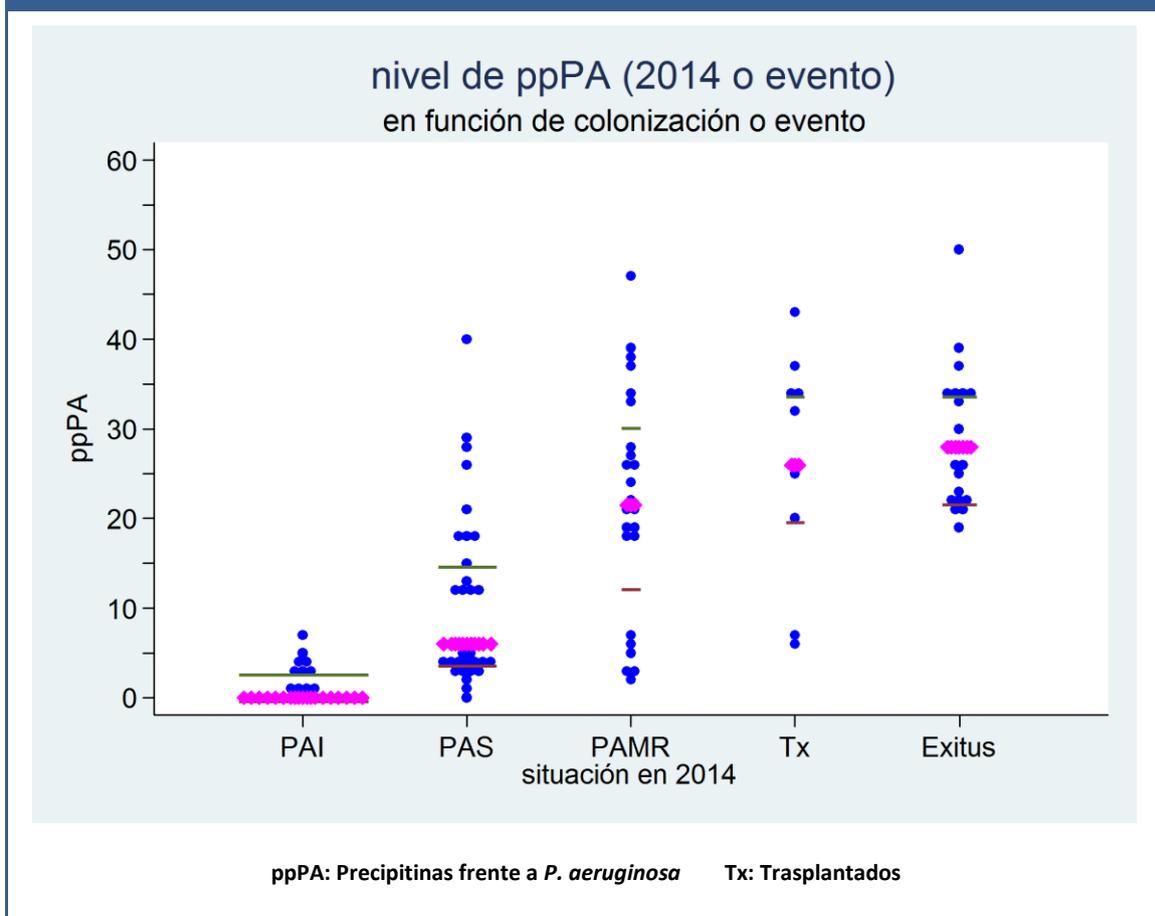
\* Test de U de Mann-Whitney

## 5. Precipitinas séricas en nuestra población con FQ.

### 5.1 Nivel de precipitinas en nuestra población (año 2014).

Los anticuerpos séricos antipseudomonas precipitantes, precipitinas, han demostrado tener un valor diagnóstico y pronóstico en la colonización/infección por *P. aeruginosa* en la FQ (110). Nuestros resultados revelan que existe un nivel de precipitinas frente a los antígenos de *P. aeruginosa* (ppPA) creciente a medida que los pacientes pasan de un estado de colonización intermitente a una situación de infección crónica. También observamos un aumento de las ppPA en aquellos pacientes infectados por *P. aeruginosa* que precisaron de un trasplante pulmonar o fallecieron (Figura 25).

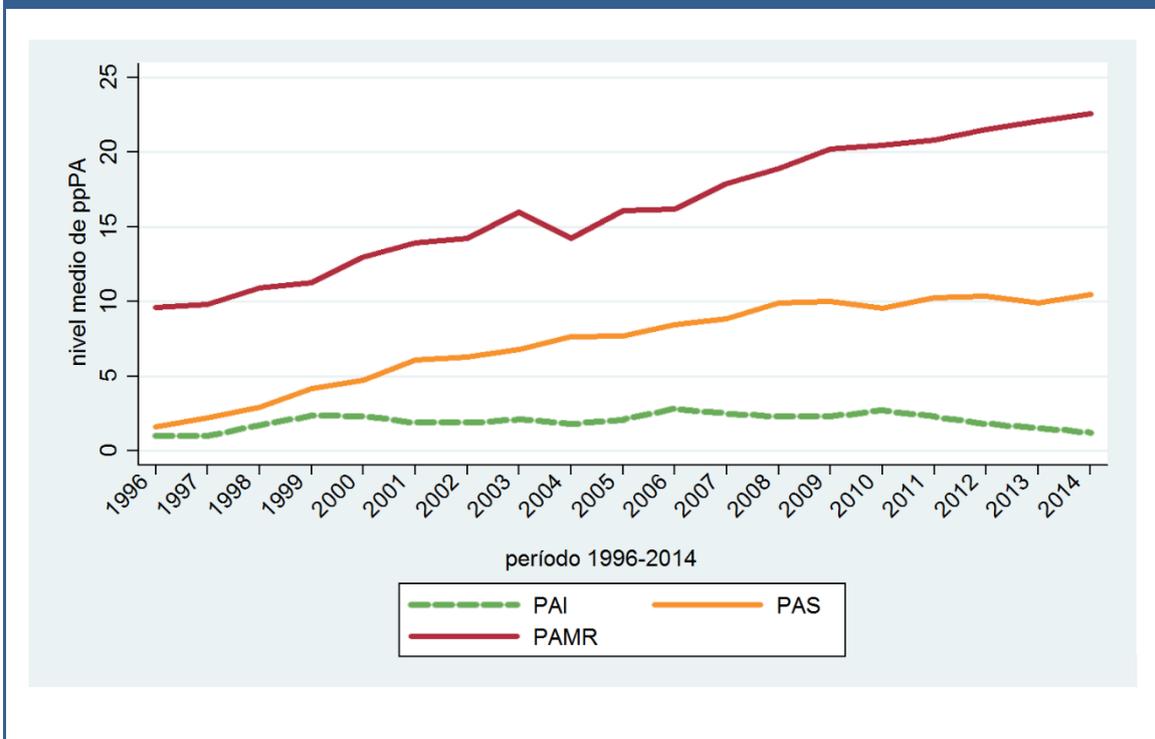
Figura 25. Nivel de precipitinas vs estado colonización por *P. aeruginosa* (2014)



## 5.2 Precipitinas vs estado de colonización por *P. aeruginosa* (1996-2014).

El análisis de los resultados de este estudio puso de manifiesto el valor de las ppPA para discriminar colonización intermitente vs crónica. El nivel promedio de precipitinas al tiempo de la primo colonización por *P. aeruginosa* fue de 1 (rango 0-5), mientras que al tiempo del establecimiento de la infección crónica fue de 6 (rango 3-15),  $p < 0,001$ ; reflejando que los niveles de precipitinas aumentan de forma notoria como respuesta del sistema inmune al establecimiento de la infección por *P. aeruginosa*. En nuestra cohorte el tiempo transcurrido desde el inicio de la colonización hasta la cronicidad fue en promedio de 4,6 años (rango 0-19 años). Con nuestros resultados de precipitinas séricas frente a *P. aeruginosa*, el hecho de que un paciente tenga de forma consecutiva durante dos años un nivel de precipitinas  $\geq 7$  clasificaría su estado como de colonización crónica con una sensibilidad del 64,6% y una especificidad del 100% (Figura 26).

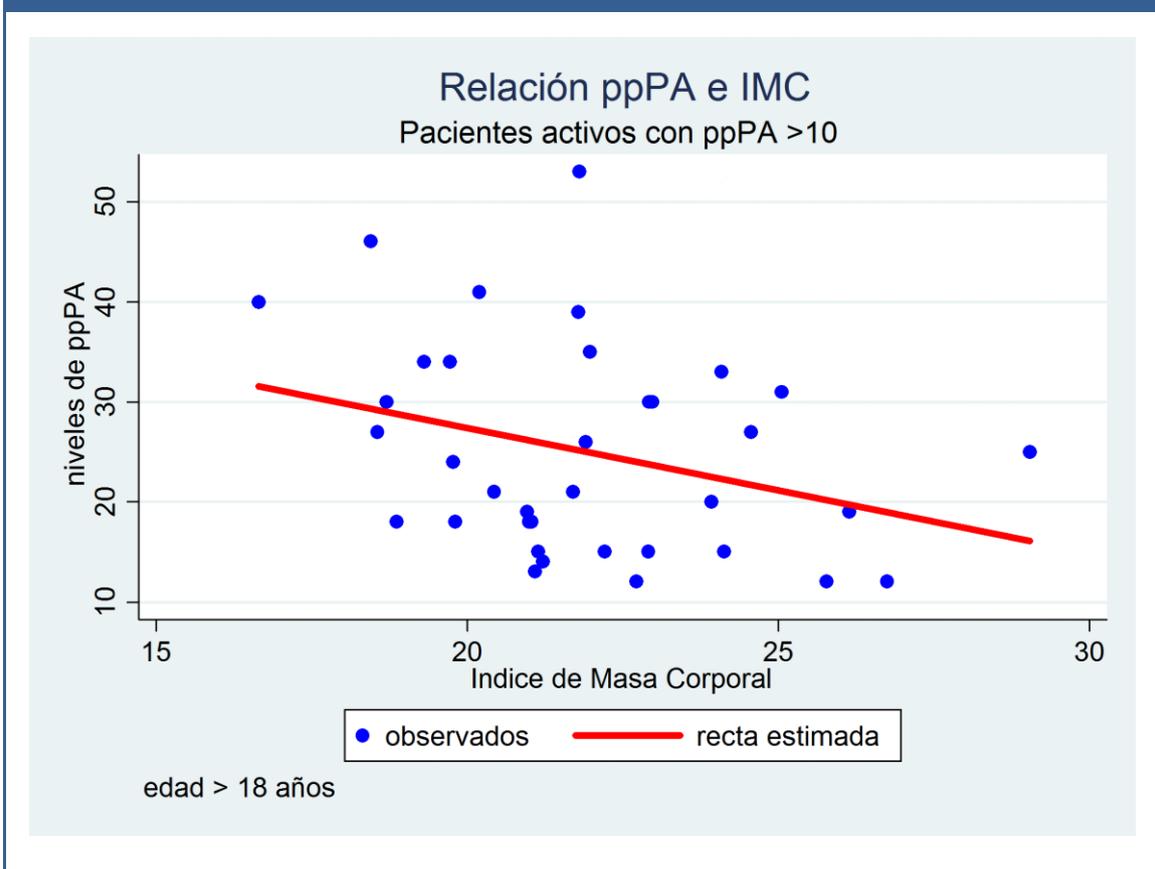
Figura 26. Precipitinas vs estado de colonización por *P. aeruginosa* (1996-2014)



### 5.3 Correlación precipitinas vs estado nutricional (IMC).

El análisis de correlación entre el nivel de precipitinas frente a *P. aeruginosa* versus índice de masa corporal, en pacientes mayores o igual a 18 años y con un nivel de precipitinas superior a 10 evidenciaba una correlación significativamente negativa con un coeficiente de correlación  $r = -0.39$ ;  $p = 0,029$  (Figura 27).

Figura 27. Correlación precipitinas vs estado nutricional (IMC)

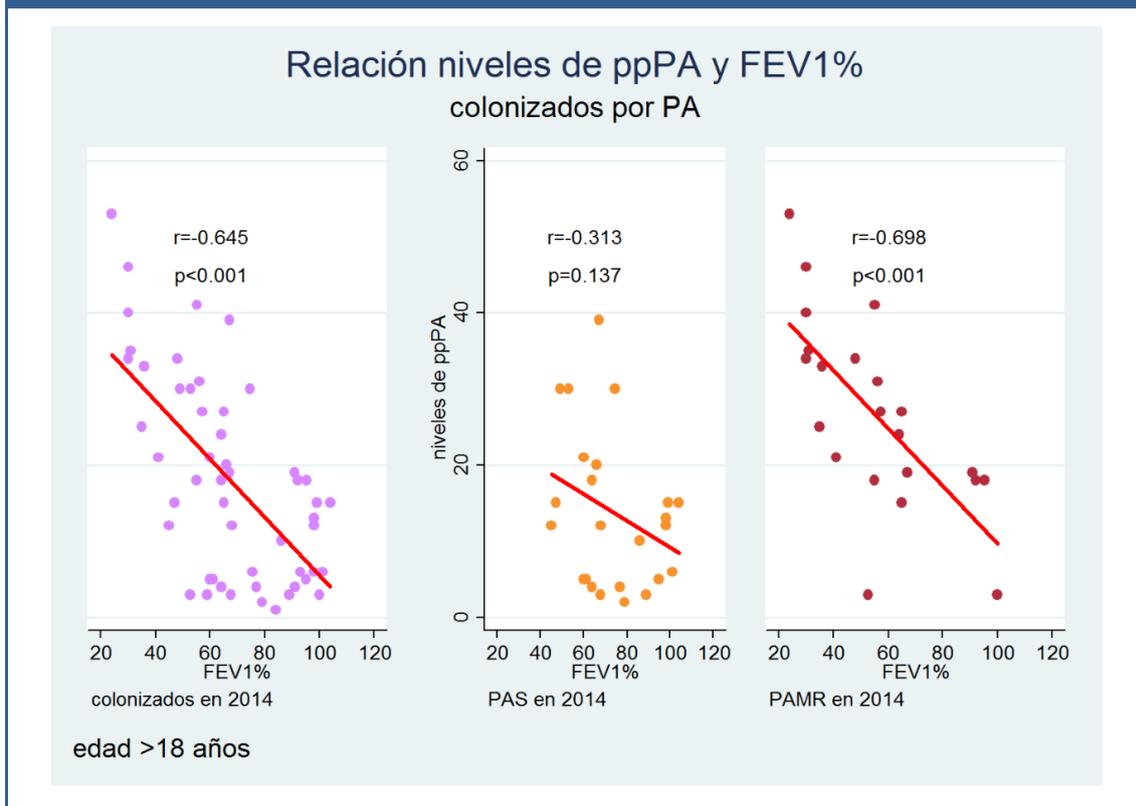


### 5.4 Correlación precipitinas vs función pulmonar.

El análisis de los resultados en los pacientes colonizados, evidenció una alta correlación negativa entre las precipitinas antipseudomonas y el FEV1% predicho, con una  $r = -0,65$ ;  $p < 0,001$ . El estudio de las subpoblaciones de los pacientes colonizados por *P. aeruginosa* reveló que esa correlación negativa se perdía en los pacientes con

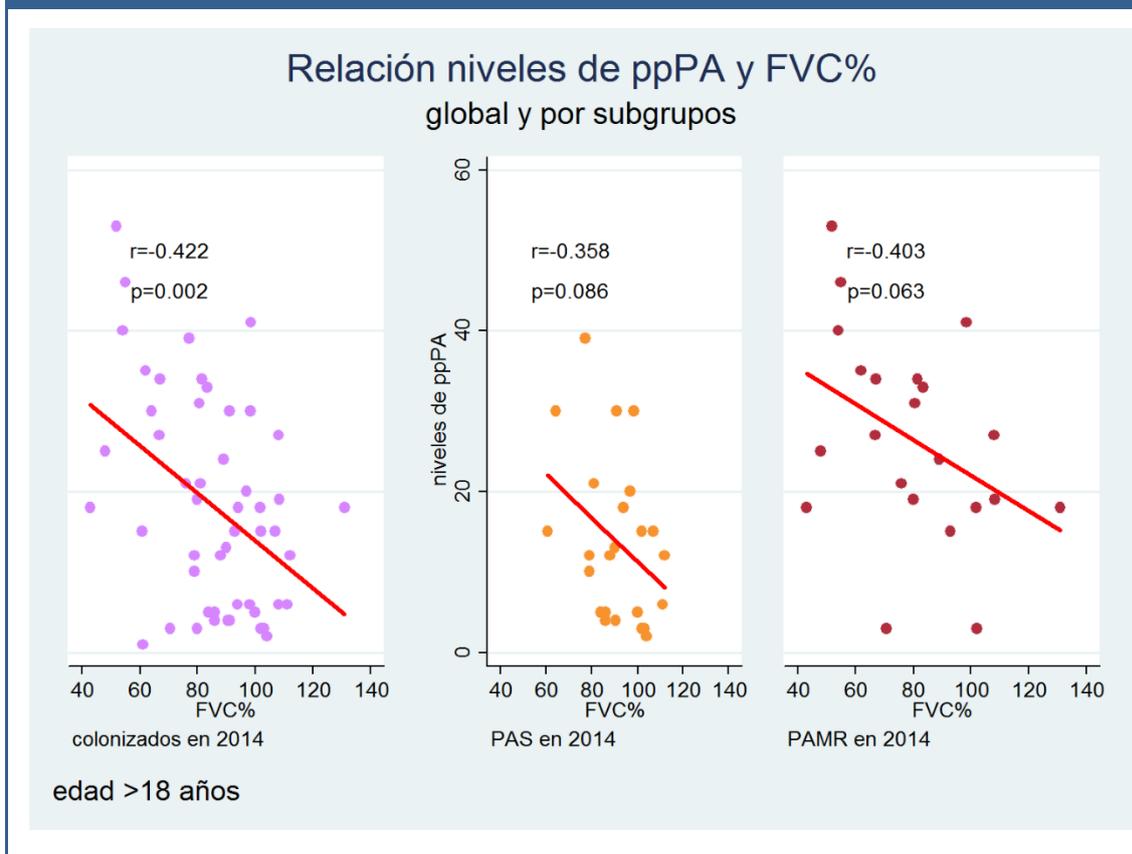
colonización intermitente, era más débil,  $r = -0,31$  en los colonizados por cepas de *P. aeruginosa* no multirresistentes (PAS), y mostraba una correlación negativa más acusada en los PAMR,  $r = -0,70$ ;  $p < 0,001$  (Figura 28).

Figura 28. Correlación precipitinas vs FEV<sub>1</sub>%



La correlación entre el nivel de ppPA vs FVC% predicho, mostraba una correlación negativa ( $r = -0,42$ ;  $p = 001$ ), menos marcada que la correlación con el FEV<sub>1</sub>%. Nuevamente era el grupo de pacientes con infección crónica por PAMR quienes tenían una peor capacidad pulmonar a medida que aumentaba el nivel de precipitinas (Figura 29).

Figura 29. Correlación precipitinas vs FVC%

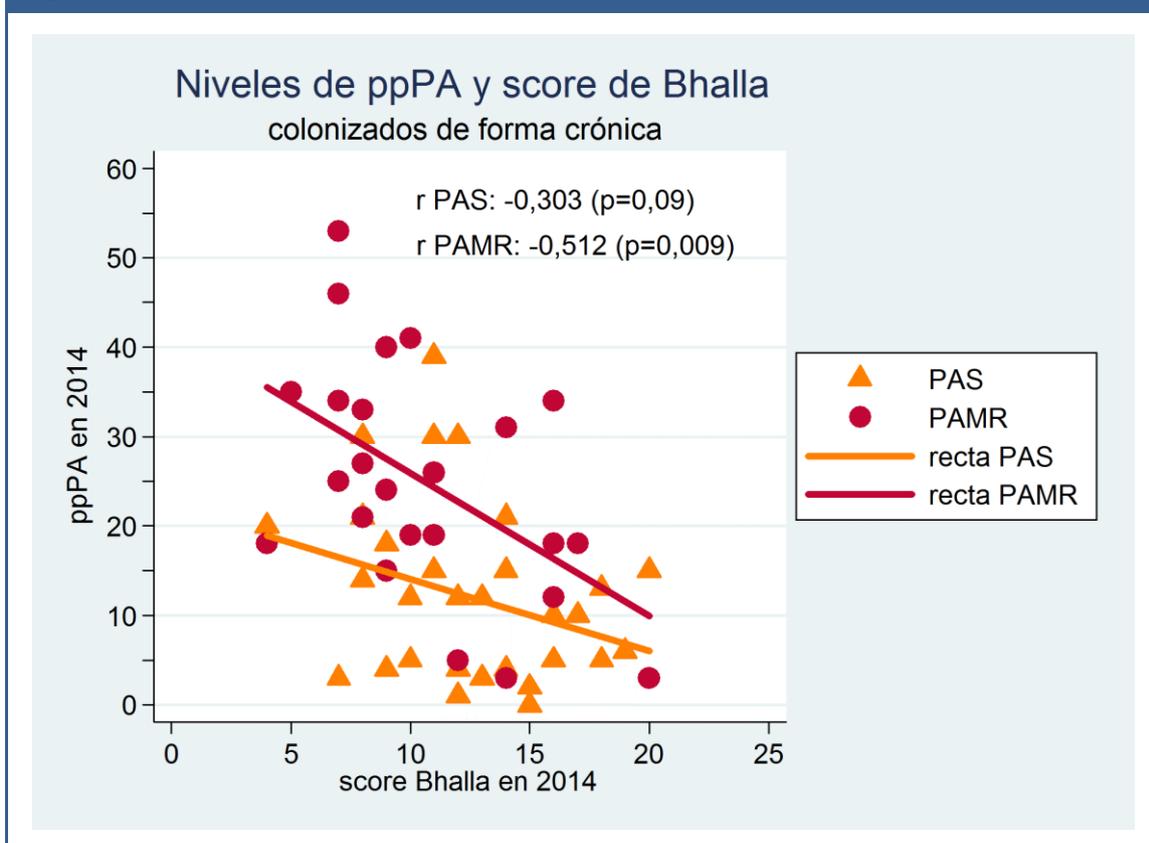


### 5.5 Correlación precipitinas vs alteraciones en la TAC “Score de Bhalla”.

El “score radiológico de Bhalla” evalúa de un modo estandarizado el daño pulmonar en los pacientes con FQ, mediante una puntuación del daño estructural objetivado en la TAC pulmonar (111). Éste “score” parte de una puntuación inicial de 25 puntos, que corresponde a un pulmón normal, y se van restando puntos a medida que se objetivan daños estructurales en la TAC, de tal forma, que un daño pulmonar mayor se corresponde con una menor puntuación.

Un análisis de la asociación entre el nivel de ppPA con el “score de Bhalla” en nuestros pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa*, evidenció una correlación de Pearson negativa con un valor  $r = -0,47$ ;  $p < 0,001$  (Figura 30).

Figura 30. Correlación nivel precipitinas séricas vs Score de Bhalla



Los resultados muestran como a medida que aumentan los niveles de ppPA, disminuye la puntuación en el score de Bhalla, es decir, existe un mayor daño pulmonar a la par que se incrementa el proceso inflamatorio reflejado a través del valor de las precipitinas séricas. El grado de correlación es mayor y estadísticamente significativa en el caso de la colonización por PAMR.

### 5.6 Valor precipitinas para predecir evento de trasplante /Exitus.

Durante los 19 años de seguimiento de la cohorte de pacientes con FQ, tuvimos 25 exitus y 15 pacientes precisaron de un trasplante pulmonar. La media de edad al trasplante fue de 28,6 años *versus* 21,8 años al fallecimiento (p=0,013). Casi dos tercios de los fallecidos fueron varones 17/25 (62%) y el porcentaje de homocigotos F508del

fue del 28% *versus* 6,7% para los pacientes fallecidos y trasplantados respectivamente. El nivel de precipitinas fue muy elevado en ambos grupos en el momento del evento, 27,9 *versus* 22,2 unidades para los fallecidos y trasplantados respectivamente. Como era previsible, la función pulmonar estaba muy deteriorada en ambos grupos, con un FEV<sub>1</sub>% predicho de 40,5% vs 36,4% para fallecidos y trasplantados respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Datos de los pacientes trasplantados y fallecidos

	Trasplantados	Exitus	Valor p
Edad evento en años; media (DE) [rango]	28,6 (8,7) [20-49]	21,8 (7,5) [7-35]	0,013
Género femenino, n (%)	7 (46,7%)	8 (32,0%)	0,354
FEV <sub>1</sub> %, media (DE) [rango]	36,4 (9,9) [24-59]	40,5 (14,9) [25-84]	0,352
FVC%, media (DE) [rango]	50,9 (13,0) [34-79]	54,6 (11,5) [39-91]	0,335
Genotipo: Homocigoto	1 (6,7%)	7 (28%)	0,143
Heterocigoto	9 (60%)	11 (44%)	
Otros	3 (20%)	1 (4%)	
Desconocido	2 (13,3%)	6 (24%)	
Insuficiencia pancreática, n (%)	13 (86%)	25 (100%)	0,135
IMC*, media (DE) [rango]	20,5 (2,0) [17,4-24,0]	19,8 (2,1) [17,0-25,0]	0,372
ppPA*, media (DE) [rango]	22,2 (13,5) [2-43]	27,9 (9,0) [5-50]	0,140

**\* Solo en pacientes de ≥ 18 años**

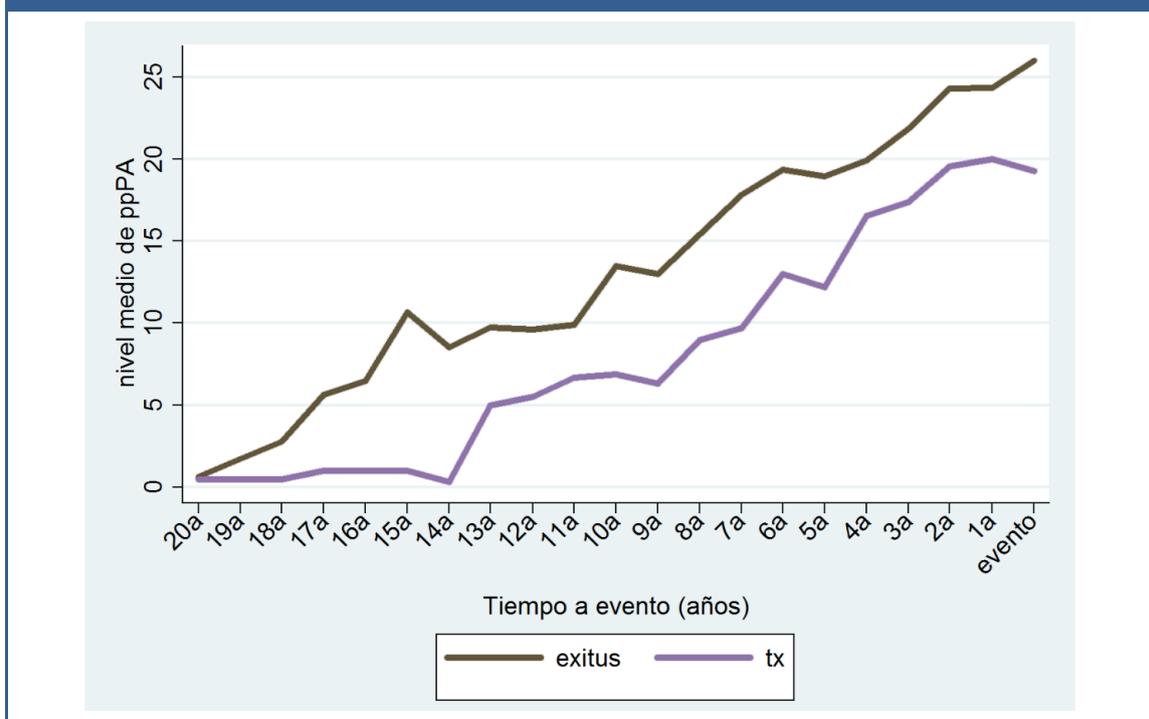
En nuestro estudio, considerando el patrón de evolución temporal de las precipitinas en estos pacientes, podemos establecer que un perfil que combina un nivel de precipitinas  $\geq 10$  durante dos años seguidos con un incremento anual de al menos 1 unidad/año durante esos dos años, presenta un alto riesgo de fallecer o tener que ser sometido a un trasplante pulmonar, probabilidad estimada del 63% (sensibilidad de 46,5%; especificidad del 87,7%).

Los resultados del nivel de ppPA y de la situación funcional de los pacientes con FQ de nuestra cohorte, nos permiten afirmar que el perfil del paciente con FQ que falleció o precisó de un trasplante pulmonar, mostraba en el momento del evento un FEV<sub>1</sub> ≤ 45% del predicho en 28/32 pacientes (87,5%) de los casos, y un nivel de precipitinas ≥ 20 en el 93,7%.

### 5.7 Evolución nivel precipitinas hasta el evento del trasplante/Exitus.

La evaluación de la variación temporal del nivel de precipitinas en los casos con evento de trasplante/exitus, nos muestra un patrón de aumento continuo de los valores medios a lo largo del período de observación. Cuatro años antes del evento en el grupo de los pacientes fallecidos y, dos años antes del evento en el grupo de trasplantados, el nivel medio de ppPA era de ≥ 20 (Figura 31). Al momento del evento, la media del nivel de precipitinas era de 27,9 y 22,2 unidades para los fallecidos y trasplantados respectivamente.

Figura 31. Evolución de las precipitinas en pacientes trasplantados y fallecidos



El análisis de los resultados seriados del nivel de precipitinas frente a *P. aeruginosa* desde su primer registro hasta la fecha del evento, mostraba dos patrones de evolución bien diferenciados. El más característico y representativo fue aquel donde el paciente comienza con un nivel de precipitinas bajo, menos de 6 unidades, seguido de un rápido y brusco crecimiento hasta niveles  $\geq 20$  unidades, acompañado de un periodo de entre 2-4 años en meseta hasta el evento de trasplante/fallecimiento (Patrón A).

Un segundo modelo, era aquel que partía de un valor inicial de ppPA elevado  $\geq 10$ , experimenta en un momento determinado un aumento brusco hasta cifras de 25 o más unidades de precipitinas, seguido de un periodo en meseta o más raramente de decaimiento hasta el evento (Patrón B) (Figura 32).

En dos pacientes fallecidos su comportamiento difería de los dos modelos anteriores, con niveles de precipitinas séricas  $< 10$  unidades al fallecimiento. Ambos estaban coinfectados, uno por SARM y el otro por una *Burkholderia cepacia*.

Estos dos patrones de evolución temporal en el nivel de precipitinas se cumplía en 11/15 (73,4%) de los pacientes que finalmente precisaron de un trasplante pulmonar (Figura 33).

Figura 32. Evolución nivel de precipitinas en los pacientes fallecidos

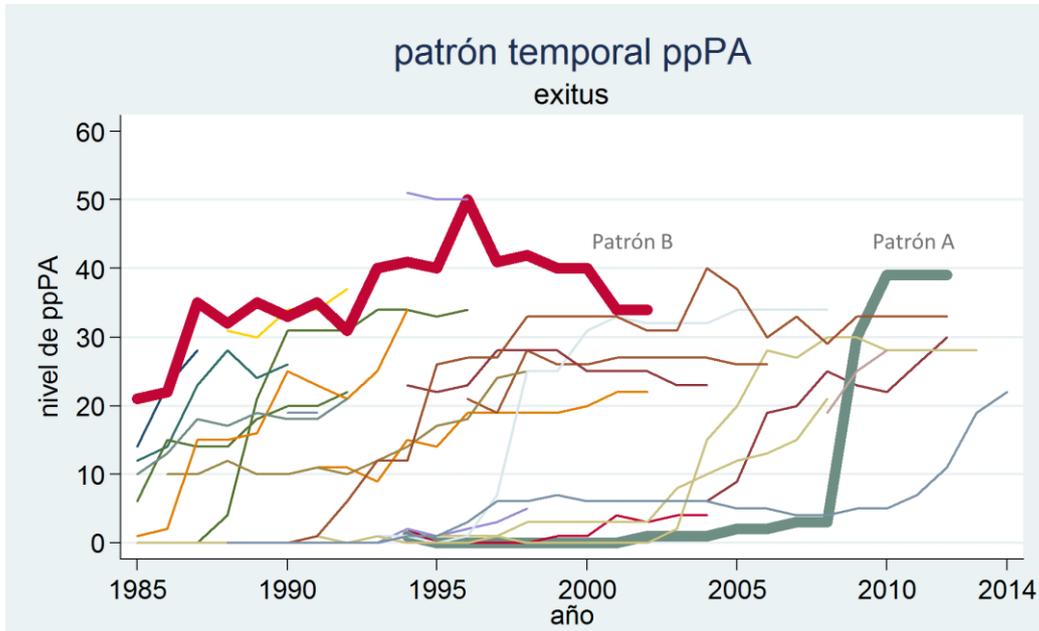
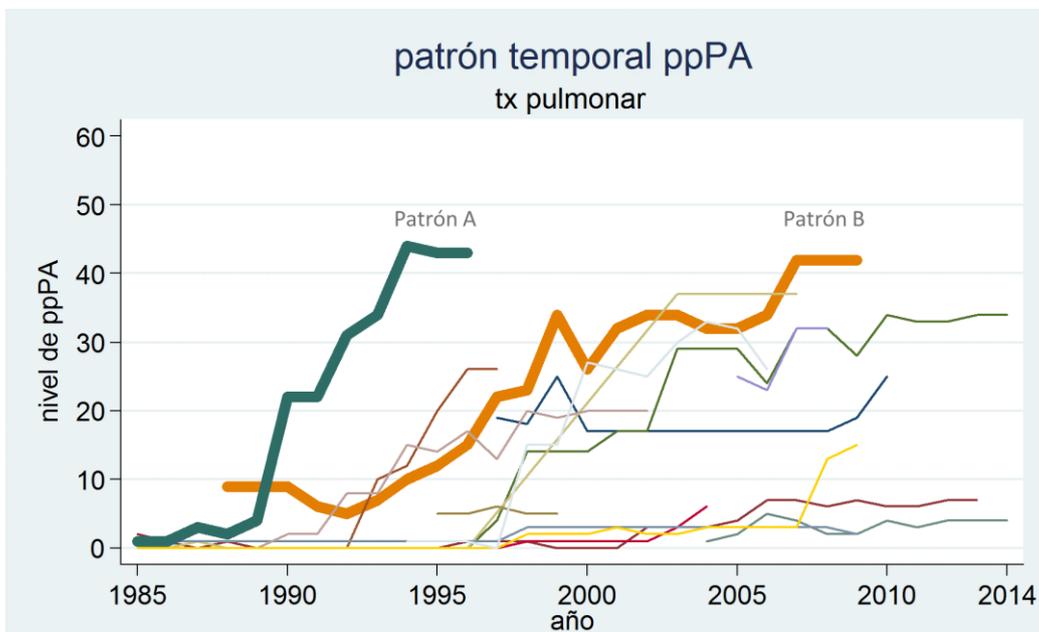


Figura 33. Evolución nivel de precipitinas en los pacientes trasplantados



## VI. DISCUSIÓN

---

La infección crónica por *P. aeruginosa* se produce hasta en el 80% de los pacientes con FQ, y es el principal determinante de la mortalidad de esta enfermedad. Es importante entender la epidemiología de esta bacteria en las personas con FQ para mejorar el abordaje clínico de esta enfermedad.

Recientemente han aparecido pruebas que demuestran que algunas cepas de *P. aeruginosa* crónicas tienen un impacto negativo en la salud de los pacientes (112). La investigación presentada en esta tesis se centró en las cepas de *P. aeruginosa* resistentes y multirresistentes, investigó la cronología de la infección pulmonar, su perfil de sensibilidad antibiótica, los factores asociados a su cronicidad y su impacto clínico.

### 1. Prevalencia de *P. aeruginosa* en nuestra población.

Las tasas de prevalencia de los diferentes patógenos en la FQ, pueden variar en función de cómo se analicen los resultados, ya sea de un solo cultivo (prevalencia puntual) o de los obtenidos a lo largo de un año (prevalencia anual), como ya se ha informado en estudios previos (113). Nosotros elegimos la prevalencia anual, con los resultados obtenidos en el año 2014, año del estudio transversal, por un doble motivo. Por un lado, es un reflejo más fiel del estado de colonización de la vía aérea y de otro lado el registro de 12 meses es el periodo preceptivo para poder diferenciar la infección intermitente versus crónica por *P. aeruginosa* según los criterios de Leeds (97).

Nuestra prevalencia anual fue de 89/196 (45,4%), que está en consonancia con lo reportado en los registros de FQ de los Estados Unidos y Canadá cuyas prevalencias para la *P. aeruginosa* en el año 2014 eran del 46% y 49,6% respectivamente (9,114). Nuestra proporción de pacientes colonizados crónicamente por *P. aeruginosa* era

globalmente de 62/196 (31,6%) y del 58,5%, en la población FQ de nuestra cohorte  $\geq$  18 años de edad.

Otros autores (115), encuentran en sus series tasas de prevalencia de *P. aeruginosa* similares (61,5%) de forma global, pero con unas tasas reducidas del 18% en pacientes menores de seis años de edad.

Recientemente han aparecido dos publicaciones que informan de un cambio en la tendencia hacia una disminución de la prevalencia de *P. aeruginosa* en la Fibrosis quística. La primera de ellas, con datos extraídos del Registro Americano de FQ, muestra una tendencia hacia la disminución de la incidencia y prevalencia de *P. aeruginosa* entre los años 2006 y 2012 (116). En el otro estudio longitudinal de una cohorte FQ, Crull y cols. (117) durante el periodo 2002-2012, encuentran que la prevalencia de *P. aeruginosa* durante ese tiempo se redujo de 73,5% en año 2002 al 67% en el 2012. También se observó un cambio de prevalencia de *P. aeruginosa* crónica fenotipo mucoide, que pasó de un 68,2% en el 2002 a un 58,1% en el 2012. Una explicación plausible de este cambio de tendencia, son las modificaciones en las características de la cohorte, con una población de homocigotos F508del que fue disminuyendo y paralelamente a un aumento en la proporción de individuos diagnosticados en la edad adulta con CFTR de clase funcional leve, clases IV y V, lo que viene a significar que la existencia de una función del CFTR residual puede derivar en una tasa menor de infección crónica. Un ejemplo de ello es un estudio reciente en pacientes con FQ y la mutación G551D que tras recibir un tratamiento con ivacaftor, lograron una disminución en la prevalencia de cultivos positivos para *P. aeruginosa*. Otro factor que ha podido influir es la utilización precoz y agresiva de pautas de tratamiento antibiótico ante una colonización reciente de *P. aeruginosa*. Se sabe que el uso de antibióticos orales e inhalados es el estándar de tratamiento para erradicar *P. aeruginosa* recién adquirida. En la población con FQ el uso de antibióticos inhalados para erradicar *P. aeruginosa* de nueva adquisición se ha asociado con una disminución en la prevalencia de la infección crónica por esta bacteria (118).

Si bien nuestras tasas de prevalencia de *P. aeruginosa* están en consonancia con lo publicado, no podemos obviar que son precisamente estos pacientes infectados crónicamente los que tienen una mayor morbimortalidad y una reducción de casi 10 años en la esperanza de vida en comparación con los no infectados (119). De ahí la importancia de conocer todo lo referente a la epidemiología de esta bacteria en nuestra cohorte, para establecer las pautas de tratamiento idóneas destinadas a retrasar y disminuir su incidencia y, de este modo, mejorar las condiciones clínicas de nuestros pacientes.

## **2. Cronología de la infección por *P. aeruginosa* y sus morfotipos.**

Los mecanismos de la colonización inicial por *P. aeruginosa*, siguen siendo un punto de debate. Hay por lo menos tres explicaciones para este mecanismo de colonización temprana. Una primera hipótesis sugiere que *P. aeruginosa* accede a las vías respiratorias y se une a las células epiteliales a través de los pili y flagelos, como consecuencia de la existencia de un gran número de receptores pili que propician su colonización.

Una segunda teoría propone que la proteína CFTR pudiera ser un receptor celular para *P. aeruginosa* y que esta proteína CFTR defectuosa de los pacientes con FQ, sería incapaz de depurar a este microorganismo del aparato respiratorio.

Una tercera teoría, señala que son las vías respiratorias del paciente con FQ las que muestran una hipersecreción mucosa y un defecto en el aclaramiento mucociliar, que va empeorando con la edad. En esas circunstancias *P. aeruginosa* podría tener ventaja para unirse a la mucosa y protegerse así de la fagocitosis (120).

Se piensa que la adquisición de *P. aeruginosa* comienza en la primera infancia, mediana de 1 año. Parece ser que el microorganismo se adquiere inicialmente de fuentes ambientales, pero también están descritos la propagación de paciente a paciente en clínicas y hospitales. Esta primocolonización del pulmón FQ se produce en general por cepas no mucoides o planctónicas, a una edad temprana (102). Con el

tiempo (mediana de 11 años) hay una transición a un fenotipo mucoide de *P. aeruginosa* que lleva asociado un mayor deterioro clínico, radiológico y de la función pulmonar.

En este punto conviene destacar que algunos autores han observado cepas de *P. aeruginosa* fenotipo mucoide y con capacidad de formar biopelículas en pacientes FQ con una infección reciente, que son clásicamente cepas asociadas con la infección crónica del pulmón.

Un examen de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de los pacientes FQ infectados crónicamente, suelen mostrar una capa de alginato que les confiere resistencia a los antibióticos y las protege contra la fagocitosis (103). Es precisamente esta facultad de *P. aeruginosa* de formar micro colonias embebidas en el “biofilm”, lo que le dota de esa capacidad para persistir crónicamente en la vía aérea del pulmón con FQ, como consecuencia de una disminución del aclaramiento y de la respuesta inmune del huésped. Un estudio ha demostrado que esta producción de alginato aumenta como resultado del ambiente de anaerobiosis relativa que se produce en la mucosa bronquial del paciente con FQ (32). Este fenotipo mucoide de *P. aeruginosa* no es exclusivo de la FQ, pues también se ve en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y en las bronquiectasias no asociadas a la FQ en una proporción menor; sin embargo, este fenotipo mucoide se observa en más del 75% de los aislados de *P. aeruginosa* en la FQ. Recientemente se ha señalado que las mujeres con FQ son infectadas por cepas mucoides de *P. aeruginosa* con mayor frecuencia y a una edad más temprana que los hombres (121) y que éste hallazgo está relacionado con la producción de estrógenos.

Con todo lo dicho anteriormente, el momento de la transformación de *P. aeruginosa* planctónicas al fenotipo mucoide en los pacientes FQ sigue sin estar aclarado, al igual que las consecuencias clínicas de tal cambio y la respuesta de anticuerpos que pueden proteger contra la colonización (122).

Nuestros resultados, de la cronología de la colonización/infección por *P. aeruginosa* mostraron que la media de edad de la primo colonización fue a los 14,5 años y la edad

media de la infección crónica fue de 19,1 años. El tiempo medio transcurrido desde la colonización inicial hasta su cronificación fue de 4,6 años (rango 0-19 años). Un 25% de los pacientes cumplía criterios de infección crónica al año del primer aislamiento, además un 75% de las cepas presentaban un fenotipo mucóide una vez establecida la cronicidad.

A la hora de comparar nuestros resultados de la cronología de la infección por *P. aeruginosa* con lo descrito en la literatura, una de las mayores dificultades encontradas es la escasez de estudios longitudinales. Sí encontramos estudios transversales referentes a la adquisición de *P. aeruginosa* planctónicas y *P. aeruginosa* mucóide usando análisis de grupos de pacientes con FQ heterogéneos y con un amplio rango de edad (123).

El estudio de Li y cols. (102) tomando como base del estudio la población con FQ del proyecto de cribado neonatal de Wisconsin examinó de forma prospectiva la epidemiología de *P. aeruginosa* y su impacto en la morbilidad pulmonar. En este estudio, la edad de adquisición de *P. aeruginosa* planctónicas y *P. aeruginosa* mucóide tuvo lugar a una media de 1 y 13 años respectivamente.

El contraste con nuestro estudio es muy llamativo, por un lado la edad tan temprana de la colonización inicial (1 año vs 14,5 años) y también la edad de la adquisición de *P. aeruginosa* mucóide, el equivalente a la infección crónica, que fue a los 13 años versus 19 años de nuestra cohorte. Esto hace que el periodo de transición desde *P. aeruginosa* planctónica a *P. aeruginosa* mucóide fuese de 10,9 años frente a los 4,5 años de media que transcurrían desde la colonización inicial hasta su cronificación en nuestro estudio. Por lo tanto, la “ventana de oportunidad” estimada para un tratamiento erradicador de la colonización inicial parece ser sensiblemente menor en nuestro estudio (4,5 años vs 10,9 años).

Parece claro que dependiendo del tipo de cohorte y del diseño del estudio la adquisición de *P. aeruginosa* sucede después de un tiempo variable (70), sin embargo la infección por *P. aeruginosa* mucóide sucede en una etapa posterior. Como ya se ha

comentado, una vez establecida *P. aeruginosa* mucóide es imposible erradicarla con el tratamiento antibiótico actual; se va haciendo más patente con la edad y conlleva una disminución de la supervivencia (124).

Nuestra observación longitudinal del momento del establecimiento de la infección crónica por *P. aeruginosa* es más tardía que la observada por Ballmann y cols. (123) que en su estudio transversal detecta *P. aeruginosa* mucóide a una edad media de 12,5 años. La trascendencia desde un punto de vista clínico de la detección precoz de la colonización por *P. aeruginosa* planctónica es muy importante pues está demostrado que en esa fase puede ser aplicado un tratamiento agresivo, de esta forma retrasaríamos la aparición del fenotipo mucóide, que parece imposible de erradicar una vez se ha establecido en la mucosa bronquial.

Por lo tanto, el intervalo de tiempo entre la colonización inicial y el desarrollo de la infección crónica mayoritariamente por cepas mucóides, ofrece una “ventana de oportunidad” para que la supresión y erradicación pueda ser posible con un tratamiento antibiótico (4).

Nuestra experiencia con la terapia antibiótica erradicadora de la colonización inicial por *P. aeruginosa* sugiere que esta modalidad de tratamiento extiende por un tiempo variable la “ventana de oportunidad”, prolongando el tiempo hasta el desarrollo de la infección bronquial crónica (125). Nuestros resultados muestran cómo los pacientes sin *P. aeruginosa* tuvieron mejores resultados clínicos y de función pulmonar. La infección crónica por *P. aeruginosa* empeoró estos resultados, especialmente en el grupo de pacientes infectados por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes (PAMR). Del mismo modo, Ballmann y cols. (123) y Parad y cols. (126) en sus respectivos estudios transversales con niños y adultos con FQ, encontraron que la infección por *P. aeruginosa* mucóide se asociaba con una disminución en el FEV<sub>1</sub>%.

En un intento de mejorar la rentabilidad diagnóstica de los cultivos de las muestras respiratorias, esputo y exudados faríngeos, y habida cuenta de las limitaciones en la obtención de muestras aptas en la población infantil, algunos autores como Burns y cols. (70) han explorado los cambios en el fenotipo y genotipo de *P. aeruginosa*

obtenidos por exudado faríngeo o lavado broncoalveolar en una cohorte de 40 pacientes FQ durante los tres primeros años de vida. Los resultados obtenidos mediante cultivo evidenciaron que el 72,5% de los pacientes tuvo en algún momento un cultivo positivo para *P. aeruginosa*; cuando combinaron los resultados serológicos y los cultivos el 97,5% de los pacientes tuvieron evidencia de infección para la edad de tres años. Concluyen que la infección por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ ocurre a edades muy tempranas y puede ser intermitente o indetectable mediante cultivo. Los estudios serológicos predijeron una mayor incidencia de la infección que la conseguida a través de los cultivos de exudado faríngeo o lavado broncoalveolar.

Estos datos son muy interesantes puesto que la respuesta inmune del organismo, como se evidencia por la producción de anticuerpos, puede reflejar una infección actual antes que el exudado faríngeo o el lavado broncoalveolar. De hecho, la “infección” se distingue de la “colonización” sobre la base de la respuesta inmune del huésped. Abundando en este concepto, un aislamiento bacteriano en el pulmón, que normalmente no es estéril, no indica necesariamente una infección sin la evidencia de una respuesta de anticuerpos frente al microorganismo infectante (127). Tener en cuenta este concepto es de gran interés, pues se ha encontrado que las pruebas serológicas que reflejan la infección por *P. aeruginosa* en la FQ, se correlacionan con la infección crónica (128).

Un dato relevante a considerar en nuestro estudio fue que la mayoría (89%) de los aislados en los niños y adolescentes  $\leq 18$  años fueron por *P. aeruginosa* planctónica, a diferencia de lo que suele observarse en las formas avanzadas de la enfermedad que suelen ser mucoides y pigmentadas. Esto apoya la hipótesis avanzada por Speert y cols. (129) que preconiza que la conversión de *P. aeruginosa* a un fenotipo mucóide, se produce bajo la presión del medio ambiente único de la vía aérea de los pacientes con FQ.

El otro hallazgo interesante en este estudio fue el alto porcentaje de aislados de *P. aeruginosa* que eran susceptibles a gran parte de los antibióticos testados, en

contraposición a los aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con enfermedad avanzada que a menudo son altamente resistentes a los antibióticos (130).

El estudio longitudinal presentado en esta tesis caracteriza la epidemiología de *P. aeruginosa* en nuestra cohorte de pacientes con FQ durante casi dos décadas. Nuestros resultados sobre el intervalo de transición desde la colonización inicial a su transformación en una infección crónica con un 75% de cepas mucoides, con las implicaciones terapéuticas que este hecho conlleva, proporcionan una información clínica muy valiosa. Nuestros pacientes con FQ pueden adquirir *P. aeruginosa* a edades tempranas de la vida y la prevalencia de *P. aeruginosa* crónica con fenotipo mucosido aumenta notablemente con la edad; eso implica que la prevención y la detección precoz de *P. aeruginosa* son críticos en su evolución.

### **3. Perfil de resistencia antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa*.**

Debido al tiempo prolongado durante el cual *P. aeruginosa* habita en las vías respiratorias de los pacientes con FQ y los repetidos ciclos de antibióticos a los que está expuesta, la resistencia a los antimicrobianos es frecuente (131). Las mutaciones ocurren con frecuencia en los genes que controlan la producción de bombas de expulsión y betalactamasas (132), y también la aparición de linajes de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los antibióticos que se expanden bajo la presión selectiva de la terapia antibiótica. Si la infección por cepas altamente resistentes de *P. aeruginosa* se asocia con peores resultados en la FQ es menos claro, y sorprendentemente pocos estudios han abordado esta cuestión.

El estudio presentado en esta tesis aborda esta cuestión desde dos perspectivas distintas. Por un lado quisimos conocer los cambios en la sensibilidad antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa* crónica que se habían producido durante los 19 años de seguimiento. Por otra parte, nos interesaba ver cómo se comportaban esas mismas cepas en cuanto a su susceptibilidad antibiótica en el año de estudio transversal frente a las diferentes familias de antibióticos antipseudomónicos.

En la primera parte del estudio, comprobamos que la práctica totalidad de los antibióticos habían experimentado un gran crecimiento en las tasas de resistencia, con la única excepción de la colistina y eso a pesar de ser uno de los antibióticos que venimos utilizando en la terapia inhalada desde hace más de 2 décadas (Figura 15).

La segunda parte del estudio, nos permitió después de testar las cepas de *P. aeruginosa* a los diferentes antipseudomónicos, etiquetar a los pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa* en 2 categorías en función de la resistencia antibiótica: Grupo A) pacientes colonizados por *P. aeruginosa* multirresistente (PAMR), (resistente a  $\geq 3$  familias de antibióticos antipseudomónicos) y Grupo B) pacientes colonizados por *P. aeruginosa* no multirresistente (PAS) (resistente a  $< 3$  familias de antibióticos antipseudomónicos). Comprobamos que el 42% de los pacientes con infección crónica cumplían criterios de mutirresistencia y el 58% eran catalogados como no mutirresistentes. Esta diferenciación es importante por dos razones. En primer lugar, por la repercusión clínica que de esto se deriva al limitar el número de antibióticos disponibles y de otro, la necesidad de segregar a estos pacientes con cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes (PAMR) del resto de pacientes para evitar las infecciones cruzadas.

Nosotros hemos podido demostrar las consecuencias clínicas negativas que se derivan de la emergencia de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes, dado que estos pacientes mostraron una peor función pulmonar respecto de las cepas sensibles (FEV<sub>1</sub>% del 58% vs 76,2%) y también un mayor número de exacerbaciones y de ingresos hospitalarios (133).

Este efecto negativo en la situación clínica de los pacientes con FQ también ha sido reflejado por Al-Aloul y cols. (134) que observaron que los pacientes con infección crónica con una cepa epidémica de *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos tenían una disminución anual aumentada en el valor de FEV<sub>1</sub> de un 4,4% y una disminución del índice de masa corporal mayor que los controles emparejados infectados con cepas no epidémicas de *P. aeruginosa*.

Lechtzin y cols. (135) examinaron el efecto en los resultados de la resistencia a múltiples fármacos durante un período de 33 meses en 75 pacientes con FQ infectados con *P. aeruginosa*. En comparación con los pacientes infectados por *P. aeruginosa* susceptibles a los antibióticos, los infectados con *P. aeruginosa* multirresistente tenían un mayor riesgo de muerte o trasplante de pulmón y un declive acelerado en el FEV<sub>1</sub>. Las razones de esto puede ser que los pacientes con FQ infectados con cepas muy resistentes obtienen menos beneficios de la terapia antimicrobiana, que el nivel de resistencia se correlaciona simplemente con el número de ciclos de antibióticos que un paciente ha recibido y por lo tanto es un marcador de enfermedad más avanzada, o que la resistencia a múltiples antibióticos es un marcador para las cepas que han mejorado la virulencia debido a otros rasgos que las acompañan (136).

No está aclarado el efecto que puedan producir estas cepas de PAMR sobre el pronóstico después de un trasplante de pulmón. Dos estudios no evidenciaron peores resultados en la supervivencia tras el trasplante pulmonar en este tipo de pacientes, pero un tercer estudio de Hadjiliadis y cols. (137) encontraron que el 43,7% de los 103 pacientes con FQ sometidos a trasplante de pulmón y que estaban infectados con bacterias multirresistentes, tuvieron una disminución en la supervivencia respecto de los pacientes infectados con bacterias sensibles (58,3% frente a 85,6% a los 5 años;  $p = 0,016$ ).

Los resultados del presente estudio muestran el aumento tan notorio que han experimentado las tasas de resistencia de *P. aeruginosa* a la práctica totalidad de los antibióticos antipseudomónicos. Este aumento en la resistencia antibiótica durante las dos últimas décadas ha sido corroborado por otros autores (138). En el estudio de Mustafa y cols. se examinó la susceptibilidad a los antibióticos dentro de una colección de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ en tres países del norte de Europa. Una observación clave fue que las tasas de resistencia eran altas en esta población, lo que confirma estudios previos de pacientes con FQ (9), y sobre todo mucho más altas que las evidenciadas en los aislados recogidos en el norte de Europa en las unidades de cuidados intensivos. Además, se descubrió un alto grado de resistencia cruzada entre antibióticos, que es importante desde el punto de vista farmacológico y clínico. Se

observó un alto grado de resistencia cruzada entre penicilinas y ceftazidima, tal como se esperaba. En contraste, meropenem, colistina y, en menor medida, tobramicina fueron activos frente a una gran proporción de los aislados, con pocas cepas resistentes a estos tres antibióticos.

Nos resulta notable el hecho de que estos tres antibióticos fueron también los más activos frente a las cepas de *P. aeruginosa* resistentes y mutirresistentes en nuestro estudio, con porcentajes de resistencia de entre el 0% y 9% para las cepas no multirresistentes, y del 21% al 32% para las cepas multirresistentes.

Estos hallazgos tienen una repercusión clínica relevante, puesto que la tobramicina y la colistina por inhalación a menudo se consideran de primera línea para la erradicación de la infección temprana por *P. aeruginosa*; la tobramicina también se considera de primera línea para los tratamientos crónicos. Las altas concentraciones conseguidas por esta vía de administración pueden ayudar a superar la resistencia (5).

Hasta la fecha, no está aclarado cómo surgen estas resistencia antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa*. Se sugiere que la resistencia puede ocurrir ya sea de forma esporádica o sin relación con el tiempo de aislamiento. En estos casos, la presencia de variantes de cepas mutantes parece predeterminar el riesgo de desarrollar resistencia en el tiempo (112).

A pesar de las limitaciones de este estudio retrospectivo y transversal, los datos analizados (evolución en el tiempo y las tasas existentes de resistencia de las cepas de *P. aeruginosa*) pueden ser de utilidad puesto que informan a los médicos de la situación de resistencia antibiótica en la FQ, para que éstos puedan seleccionar los antimicrobianos más idóneos sobre la base de las pruebas de sensibilidad realizadas en los aislados actuales.

#### 4. Factores asociados con la colonización/infección por *P. aeruginosa*.

La identificación de los factores asociados con la adquisición inicial de *P. aeruginosa* es de gran importancia para el manejo clínico de los pacientes con FQ. Hay que tener en cuenta que los aislados de *P. aeruginosa* al inicio de la colonización están presentes con una densidad escasa, y con unas características fenotípicas similares a los aislados del medio ambiente, un fenotipo planctónico y muy susceptibles a los antibióticos, es por eso que se recomienda una estrategia de identificación temprana, para que un tratamiento agresivo pueda prevenir o retrasar la aparición de la infección crónica (139).

Los factores de riesgo del paciente para la adquisición inicial de *P. aeruginosa* han sido evaluados en diversos estudios (108). En el estudio prospectivo de Rosenfeld y cols. llevado a cabo en una cohorte de pacientes con FQ fueron identificados como factores de riesgo para adquisición de *P. aeruginosa*, el genotipo CFTR, el sexo femenino, la edad al diagnóstico y la insuficiencia pancreática (108). En la población infantil con FQ, el género, una función pulmonar disminuida, el genotipo y la ausencia de *S. aureus* meticilin resistente en la secreciones respiratorias, ha sido relacionado con la adquisición de *P. aeruginosa* (140).

Sin embargo, los predictores de *P. aeruginosa* crónica no han sido suficientemente descritos en la literatura. Esto puede deberse en parte a que no existe una definición de infección crónica por *P. aeruginosa* universalmente aceptada. También es reconocido que la terapia antibiótica agresiva para erradicar la adquisición reciente de *P. aeruginosa* de las vías respiratorias, alarga el tiempo entre la adquisición inicial y el desarrollo de infección crónica (125).

##### Genotipo:

Los resultados de esta tesis mostraban que la edad, la edad al diagnóstico, el genotipo, el índice de masa corporal, el FEV<sub>1</sub>%, la FVC%, el número de ingresos hospitalarios, los niveles de precipitinas séricas, la coinfección por *Stenotrophomonas* y *Aspergillus*

*fumigatus* eran factores asociados a la infección crónica por *P. aeruginosa* en el análisis univariado.

Tras el análisis multivariante, tres variables permanecían asociadas a un mayor riesgo de colonización/infección crónica por *P. aeruginosa*. Ser homocigoto para la mutación F508del frente a ser heterocigoto; la coinfección por *Aspergillus* spp. y el nivel de precipitinas séricas frente a *P. aeruginosa*.

Nuestros resultados vienen a confirmar la importancia que tiene el genotipo en su forma homocigota F508del como factor asociado al desarrollo de infección crónica por *P. aeruginosa*, como ya ha sido puesto de relieve en el estudio de Psoter y cols. (109). En este estudio retrospectivo realizado en pacientes con  $\leq 6$  años de edad con los datos tomados del Registro Americano de fibrosis quística durante el periodo 2003-2009, encuentran que la adquisición inicial de *P. aeruginosa* ocurrió en un 48% de los pacientes, con un tiempo medio hasta la adquisición de 1,2 años. Los factores asociados que encontraron fueron tener un seguro público, ser homocigotos para la mutación F508del o tener otras mutaciones del gen CFTR con mínima función. Hubo una gran variabilidad geográfica en la adquisición de *P. aeruginosa* oscilando entre el 21% y el 71% según los diferentes estados.

Este hallazgo de la variabilidad geográfica en la prevalencia de *P. aeruginosa*, viene a señalar la importancia que tienen los estudios epidemiológicos que nos permiten tener un conocimiento detallado de los factores que inciden en el desarrollo de la infección por *P. aeruginosa* a nivel local.

Una visión del problema desde la otra orilla es la que obtuvieron Crull y cols. (117) en un estudio retrospectivo sobre una población de  $\geq 18$  años; la infección crónica por *P. aeruginosa* fue definida al igual que en nuestro estudio según los criterios modificados propuestos por Lee y cols. (97). Estos autores identifican los factores que se asociaban con una menor probabilidad de desarrollar una infección crónica por *P. aeruginosa*, como tener una buena función pulmonar basal y un diagnóstico tardío de FQ después de los 25 años de edad.

### Precipitinas:

Se conoce desde hace décadas, que la respuesta humoral inicial a la exposición bacteriana de los pulmones en la FQ es la producción de IgA secretora por células plasmáticas en la mucosa pulmonar, seguida por una liberación sistémica de anticuerpos séricos IgG (141). En la FQ, la infección crónica por *P. aeruginosa* se sigue de una inflamación de la vía aérea, lo que resulta en una liberación importante de mediadores inflamatorios e inmunológicos procedentes del epitelio respiratorio, macrófagos y neutrófilos circulantes (142).

Esta respuesta de anticuerpos frente a *P. aeruginosa* se puede utilizar, y de hecho se viene utilizando desde la década de los años 70 del siglo pasado, como un biomarcador, puesto que la inflamación y el daño tisular pulmonar están relacionados con el nivel de anticuerpos séricos (68), de modo que se produce un aumento de estos anticuerpos específicos contra antígenos de *P. aeruginosa* cuando se establece una infección pulmonar crónica por este microorganismo (143).

Nuestro equipo de la Unidad de FQ del País Vasco, viene utilizando este biomarcador desde la década de los 80, como una prueba diagnóstica y pronóstica de la colonización/infección por *P. aeruginosa*, que complementa los hallazgos microbiológicos de las secreciones pulmonares.

En el presente estudio tras realizar un análisis multivariante con un modelo estricto ( $p < 0,05$ ), la variable con una mayor asociación con la variable de respuesta (infección crónica por *P. aeruginosa*) fue el nivel elevado de precipitinas séricas con un incremento del 50% en el riesgo de colonización por cada unidad de aumento en el nivel de las precipitinas (OR 1,52; IC 95%: 1,29-1,79).

Esta asociación entre un nivel elevado de precipitinas y el estatus clínico derivado de la infección crónica por *P. aeruginosa* ha sido estudiado por otros autores. Los estudios pioneros en el diagnóstico serológico de la infección por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ se iniciaron en la década de los 70 por Hoiby y cols. (105). Basándose en la detección de anticuerpos precipitantes (precipitinas) determinados mediante

inmunoelectroforesis cruzada (técnica utilizada en nuestro estudio), realizaron un seguimiento de 133 pacientes con FQ durante 5 años, confirmando que los niveles elevados de precipitinas se correlacionaban con alteraciones radiológicas graves, una peor función ventilatoria y peor pronóstico. En este mismo sentido, el estudio de Brett y cols. (144) observó en pacientes con colonización/infección por *P. aeruginosa* intermitente y crónica una correlación entre el aumento de anticuerpos séricos IgG frente a *P. aeruginosa* y una peor puntuación en el “score” radiológico de Chrispín-Norman.

En un amplio estudio longitudinal Pressler y cols. (145) realizaron un seguimiento de 791 pacientes con FQ, encontrando que 11 de 381 pacientes sin colonización por *P. aeruginosa* pasaron a estar infectados crónicamente, y 24 de 129 colonizados intermitentemente pasaron a estar infectados crónicamente. El nivel de anticuerpos en el grupo de infectados crónicamente era más altos que al inicio del estudio y fue aumentando significativamente durante el periodo de seguimiento. Este estudio, al igual que lo evidenciado en los resultados de esta tesis, viene a confirmar que los niveles elevados de anticuerpos específicos antipseudomonas son un marcador del riesgo de desarrollo de la infección pulmonar crónica por este microorganismo.

#### Coinfección por *Aspergillus* spp.:

La tasa de aislamientos de *Aspergillus* spp. a partir de muestras respiratorias de pacientes con FQ varía ampliamente (entre un 6% y un 58% en la literatura medica) (146) y esto es cierto para pacientes adultos y pediátricos. La utilización de diferentes técnicas de muestreo como los exudados faríngeos, esputos o el lavado broncoalveolar (LBA) pueden afectar a las tasas de detección de *A. fumigatus*.

Los pacientes con FQ con frecuencia reciben antibacterianos de amplio espectro a través de una variedad de rutas incluyendo la vía oral, intravenosa y cada vez más de forma nebulizada, ya sea como profilaxis o para el tratamiento de exacerbaciones respiratorias. Varios estudios han puesto de manifiesto la asociación entre el uso de los antibacterianos nebulizados y el aislamiento de *Aspergillus* spp. en la vía aérea. Un estudio multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo para el tratamiento de la

infección por *P. aeruginosa* con tobramicina inhalada de forma intermitente durante 24 semanas en 520 pacientes con FQ mayores de 6 años, encontró un aumento significativo de la colonización por *A. fumigatus* en el grupo tratado con tobramicina (147). Estos resultados han sido refrendados por dos estudios de cohortes retrospectivos que investigaron la asociación entre la colonización por *A. fumigatus* y la terapia antibacteriana por vía inhalada. En uno de estos estudios Vrankijer y cols. revisaron las historias clínicas e informes de muestras respiratorias de 259 niños y adultos. En un modelo de regresión logística múltiple, los autores encontraron que la colonización por *A. fumigatus* se asoció de forma independiente con el uso de los antibióticos inhalados ( $p = 0,001$ ) (146). Esto también ha sido refrendado en una gran cohorte de pacientes adultos con FQ donde la colonización por *A. fumigatus* también se asoció con el uso de antibióticos orales.

Parece evidente que la relación entre el uso de antibióticos y la colonización por *A. fumigatus* es un problema complejo que requiere de más estudios para su aclaración. La presión selectiva de los antibacterianos puede reducir la competencia y dejar un nicho sin cubrir favoreciendo la colonización e infección por *Aspergillus* spp. A partir de la evidencia disponible, parece que el tratamiento antibiótico inhalado, particularmente con la tobramicina, puede estar asociada con un aumento de la colonización por *A. fumigatus*.

Como era previsible, en nuestro estudio todos los pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa* habían recibido tratamiento antibiótico durante largos periodos de tiempo tanto por vía oral y endovenosa en las exacerbaciones infecciosas pulmonares y, por vía inhalada de forma continuada en todos ellos como parte de la terapia de mantenimiento de los pacientes con infección crónica.

Nuestros resultados mostraban que existía una colonización múltiple de dos o más patógenos en el 32,2% de los pacientes, siendo la más frecuentes la coinfección del *S. aureus*/otra bacteria en 33 (16,8%) y de *P. aeruginosa*/otra bacteria in 28 (14,4%) de los pacientes. La coinfección del hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus* con *P. aeruginosa* estaba presente en 47/62 (75,8%) de los pacientes con *P. aeruginosa*

crónica. El análisis de regresión logística univariante y multivariante, indicaba que la presencia de coinfección por *Aspergillus fumigatus* se asociaba significativamente con el desarrollo de infección crónica por *P. aeruginosa* (OR= 4,21; IC 95%: 1,35-13,7).

¿Qué dice la literatura médica al respecto?

Los estudios que han investigado la asociación colonización e infección entre *Pseudomonas* y *Aspergillus* spp. han producido resultados contradictorios. Un estudio retrospectivo en niños con FQ canadienses encontró una relación significativa entre la infección respiratoria por *P. aeruginosa* y *Aspergillus* spp. (148) pero esto no ha sido corroborado consistentemente en la literatura.

Una revisión reciente de los adultos y los niños holandeses con FQ encontró una asociación entre la colonización por *Aspergillus* y la infección crónica por *P. aeruginosa* en el análisis de regresión logística simple que desapareció en un modelo de regresión logística múltiple (146). Los autores especulan que son diversos los factores de confusión que pueden haber influido en estos resultados. Vieron que los pacientes con una mayor duración de la colonización eran mayores ( $p < 0,001$ ), eran más propensos a usar antibióticos inhalados, ( $p < 0,001$ ), tenían un valor del FEV<sub>1</sub> disminuido ( $p < 0,001$ ) y habían tenido más hospitalizaciones ( $p = 0,02$ ).

La pregunta clínica clave, por supuesto, es si el hongo *Aspergillus* spp. es cocausante del deterioro clínico y funcional en la FQ por derecho propio o si los hongos filamentosos no son más que unos patógenos oportunistas, que aprovechan las alteraciones estructurales e inmunológicas de la vía respiratoria junto con la presión antibiótica sobre otras especies patógenas, para colonizar de forma crónica los pulmones de los pacientes con FQ. No existen estudios prospectivos para responder a esta pregunta.

Un amplio estudio retrospectivo reciente de una cohorte de niños con FQ analizó los datos recogidos de los pacientes durante un período de siete años. La infección por *Aspergillus* spp. fue definida como la existencia de dos o más muestras de esputo positivos o un lavado bronco alveolar (LBA) positivo en un año. Los niños con infección

por *Aspergillus* spp. tenían un FEV<sub>1</sub>% menor durante el período de estudio en comparación con los niños no infectados (148). En un modelo de regresión logística, los niños con infección por *Aspergillus* spp. tuvieron un riesgo aumentado de sufrir exacerbaciones pulmonares que precisaron de hospitalización (RR = 1,94; p= 0,0002). Al igual que lo encontrado en nuestra cohorte de pacientes con FQ del País Vasco, hubo una fuerte asociación entre la infección por *Aspergillus* spp. y la tasa de aislamientos de *Pseudomonas*.

Muy distintos fueron los hallazgos en un estudio realizado en una cohorte de 85 niños con FQ, con una edad media de 8,5 años y un periodo de observación medio de seis años. Los autores no encontraron ninguna asociación significativa entre la colonización por *Aspergillus* (definida como dos o más muestras positivas para *Aspergillus* spp. a lo largo de un período de un año) ni con el FEV<sub>1</sub>% del predicho, el índice de masa corporal o cualquier otra medida de la gravedad de la enfermedad (149).

La interacción entre los patógenos respiratorios *P. aeruginosa* y el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus* es probable que sea un problema complejo y precisa de estudios adicionales. Si la presencia de ambos microorganismos simultáneamente tiene un efecto perjudicial acumulativo en el epitelio respiratorio de los pacientes con FQ está por demostrar.

## **5. Impacto clínico de la colonización/infección por *P. aeruginosa*.**

Durante mucho tiempo se ha visto que la infección por *P. aeruginosa* se asocia con peores resultados en las personas con FQ. En uno de los primeros estudios que muestra esta relación entre la infección por *P. aeruginosa* y un aumento de la mortalidad, Wilmott y cols. observaron la supervivencia de 117 niños con infección por *P. aeruginosa* establecida en 1974. De los 31 niños que fueron infectados con *P. aeruginosa* en ese momento, el 53% sobrevivió a la edad de 16 años, mientras que el 84% de los que no estaban infectados con *P. aeruginosa* sobrevivió a esta edad (150). La supervivencia fue peor en los pacientes que fueron infectados con *P. aeruginosa* a

una edad más temprana. Otros posteriormente han confirmado la asociación entre la infección por *P. aeruginosa* y la mortalidad (151).

Además de la disminución en la supervivencia, la infección por *P. aeruginosa* se asocia con una peor función pulmonar, peores puntuaciones en la radiología del tórax (152), un crecimiento más lento del paciente, y un aumento de la sintomatología diaria (153).

Nuestros Resultados:

Los resultados de esta tesis muestran cómo los pacientes sin *P. aeruginosa* tenían escasa repercusión clínica con una función pulmonar media relativamente normal. La adquisición de *P. aeruginosa* empeoró ligeramente estos resultados, y la transición desde un estado de colonización intermitente por *P. aeruginosa* a *P. aeruginosa* crónica mucoide llevó a un deterioro significativo en estos resultados.

Cuando comparamos los datos clínicos de los pacientes con infección por *P. aeruginosa* intermitente versus *P. aeruginosa* crónica, apreciamos que los pacientes con *P. aeruginosa* crónica tenían un peor índice de masa corporal (IMC) y también un FEV<sub>1</sub>% más bajo. La distribución del tipo de infección por *P. aeruginosa* intermitente vs crónica, variaba según los grupos de edad. La infección intermitente por *P. aeruginosa* era de un 26% en los mayores de 18 años, por el contrario las cepas de *P. aeruginosa* crónica afectaban en un 58,5% a los pacientes  $\geq$  18 años de edad.

Comparando los resultados de la cohorte en su conjunto, el FEV<sub>1</sub>% era del 88,5% en los no colonizados por *P. aeruginosa* vs 69,3% en los pacientes colonizados crónicamente por *P. aeruginosa*. La repercusión clínica en el paso de *P. aeruginosa* intermitente a *P. aeruginosa* crónica supuso una caída en el FEV<sub>1</sub> del 12,5%. Un análisis pormenorizado de los pacientes con *P. aeruginosa* crónica, indicaba que había diferencias en el FEV<sub>1</sub>%, con cifras del 77,5% para los infectados por *P. aeruginosa* no multirresistente vs 58,8% para los infectados por *P. aeruginosa* multirresistente.

Hubo también diferencias estadísticamente significativas en el número de exacerbaciones y número de ingresos hospitalarios durante los cinco años previos al año del estudio de corte transversal entre los pacientes con infección intermitente

*versus* crónica, y también hubo diferencias significativas entre los pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa* multirresistente vs los infectados por *P. aeruginosa* no multirresistente (Tabla 7).

Nuestros hallazgos sugieren que la colonización intermitente por *P. aeruginosa* no causa un daño estructural o funcional pulmonar significativo y que la prevención de la transformación a un estatus de infección crónica por *P. aeruginosa* pueden ayudar a preservar los pulmones de estos pacientes.

En la literatura médica encontramos diferentes estudios que corroboran la asociación entre la infección por *P. aeruginosa* con un deterioro clínico y funcional acelerado en los pacientes con FQ. En este sentido, Ballmann y cols. (123) y Parad y cols. (126), en los análisis transversales de las cohortes de niños mayores y adultos con FQ, encontraron que la infección crónica por *P. aeruginosa* mucóide se asoció con una disminución en el porcentaje de FEV<sub>1</sub>.

En otro estudio Schaedel y cols. examinaron factores que influyen en la función pulmonar en pacientes con FQ y  $\geq 7$  años. Ellos encontraron que la infección crónica con *P. aeruginosa* aumentó el riesgo relativo en el deterioro del FEV<sub>1</sub> de 1,7 a 3 veces (154).

Emerson y cols. llevaron a cabo un estudio basado en datos de 3.323 niños de 1 a 5 años del registro de pacientes con FQ Americano (155). Los niños con cultivos respiratorios positivos a *P. aeruginosa* durante el primer año del estudio tuvieron un aumento de 2,6 veces en la mortalidad durante los 8 años de seguimiento en relación a los niños que tenían cultivos negativos para *P. aeruginosa*. La infección también se asoció con un menor FEV<sub>1</sub>%, un percentil de peso más bajo, y un aumento de la frecuencia de hospitalización por exacerbación respiratoria aguda.

Impacto clínico:

Un gran número de estudios han tratado de desentrañar el impacto del fenotipo mucóide en los resultados en la FQ. La interpretación de estas investigaciones se complica por el hecho de que algunos expertos consideran que la emergencia del

fenotipo mucóide coincide con la transición desde la fase intermitente a la fase crónica de la infección (156), mientras que otros creen que la infección crónica por lo general precede a la aparición de *P. aeruginosa* mucóide (123). Nuestros resultados indican que pueden ser coincidentes en el tiempo, e incluso excepcionalmente puede verse la colonización inicial con un fenotipo mucóide de *P. aeruginosa*.

Independientemente de estas diferencias, es evidente que la infección crónica por *P. aeruginosa* se asocia con unos resultados más pobres en los pacientes con FQ. Pedersen y cols., realizaron una espirometría anual en 73 pacientes con FQ durante un período de 13 años (64). Los pacientes infectados con cepas mucóides de *P. aeruginosa* tenían valores del FVC% más bajos que los pacientes infectados con cepas no mucóides de *P. aeruginosa*.

En un estudio longitudinal, Demko y cols. observaron que 34 de 130 pacientes (26%) que fueron infectados crónicamente con cepas mucóides de *P. aeruginosa* antes de los 6 años de edad murieron durante los siguientes 10 años, mientras que sólo 21 de 361 pacientes (6%) que fueron infectados crónicamente con *P. aeruginosa* mucóide después de los 6 años de edad murieron ( $p < 0,0005$ ) (157). También observaron diferencias significativas entre estos dos grupos en las puntuaciones de la radiografía de tórax y los valores del FEV<sub>1</sub> %, con un declinar acelerado del 2,5 por año después de la infección crónica por *P. aeruginosa* mucóide.

En conjunto, estos estudios demuestran que la aparición de cepas mucóides de *P. aeruginosa* es un factor de mal pronóstico para los pacientes con FQ. Sin embargo, no está claro si el fenotipo mucóide causa realmente estos resultados clínicos tan pobres o más bien es un marcador de cepas altamente adaptadas que han aumentado su virulencia debido a otras mutaciones.

La asociación del fenotipo mucóide con los malos resultados en la FQ plantea una pregunta: ¿Puede una infección por cepas no mucóides de *P. aeruginosa* causar un aumento de la morbilidad y la mortalidad en estos pacientes?

Aunque controvertido, la evidencia actual sugiere que la infección por *P. aeruginosa* no mucóide no se asocia con tan malos resultados como con las cepas mucóides de *P.*

*aeruginosa*. Ballmann y cols. en un estudio con un diseño similar al nuestro, dirigido a dar respuesta a esta cuestión, estudiaron la evolución en 40 pacientes a través de cuatro etapas de la infección: (i) primera detección de *P. aeruginosa*, (ii) infección crónica *P. aeruginosa*, (iii) primera detección de cepas mucoides de *P. aeruginosa*, y (iv) la infección crónica por *P. aeruginosa* mucoide (123). No observaron una disminución significativa en la función pulmonar con el primer aislamiento de *P. aeruginosa* o con la infección crónica con *P. aeruginosa* no mucoide. En cambio, si observaron una disminución significativa en el FEV<sub>1</sub>% después de la primera detección de cepas mucoides y después de la infección crónica con *P. aeruginosa* mucoide. Por el contrario, Li y cols., hicieron notar una tendencia hacia el empeoramiento clínico y radiológico con el primer aislamiento de cepas no mucoides de *P. aeruginosa* (102).

No cabe duda de que son necesarios estudios adicionales para determinar si la infección por cepas no mucoides de *P. aeruginosa* tiene un impacto negativo sobre la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística.

## **6. Precipitinas séricas frente a *P. aeruginosa*.**

La detección de *P. aeruginosa* en la rutina diagnóstica se hace sobre todo a través del cultivo de esputo con expectoración espontánea. Sin embargo, muchos pacientes (especialmente los niños menores de 6 años) son incapaces de producir un espécimen de esputo; en estos individuos se utilizan como sustituto del esputo el frotis faríngeo o excepcionalmente el cultivo procedente del lavado broncoalveolar (LBA). Estas muestras del tracto respiratorio superior se supone que reflejan el estado microbiológico de las vías respiratorias inferiores (63). Se sabe que un cultivo negativo de las vías respiratorias superiores no excluye la presencia de *P. aeruginosa* en las vías respiratorias inferiores. Errores de muestreo durante el LBA y la muestra insuficiente que con frecuencia se obtiene en los frotis faríngeos pueden conducir a falsos resultados negativos (158). La dificultad en la obtención de muestras respiratorias representativas de las vías respiratorias de los bebés y niños indica la necesidad de la

utilización de otros métodos que pueden complementar o ser una alternativa al cultivo microbiológico.

La detección de anticuerpos séricos frente a *P. aeruginosa* ha surgido como un método auxiliar para evaluar la terapia de erradicación temprana. Estos métodos altamente sensibles para la detección de anticuerpos contra varios antígenos de *P. aeruginosa* pueden complementar los métodos de control utilizados en la actualidad (61). Los resultados positivos de los anticuerpos y las muestras con cultivo negativo de la secreción respiratoria deben alertar a los médicos para realizar una búsqueda exhaustiva encaminada a detectar una probable infección. Sin embargo, el aumento de los niveles de anticuerpos se asocia con una mayor probabilidad de infección crónica por *P. aeruginosa*. Los niveles elevados de anticuerpos en el momento del cultivo inicial de *P. aeruginosa* pueden ser una herramienta útil para los clínicos y los investigadores que atienden a los pacientes con FQ en riesgo de infección pulmonar. No obstante, su uso en la práctica habitual sigue siendo controvertido (159).

Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar el valor diagnóstico de las precipitinas en relación con los resultados microbiológicos de las secreciones respiratorias, y también, averiguar el valor pronóstico de estos anticuerpos en anticipar la evolución futura de los pacientes hacia un evento de trasplante o fallecimiento.

Nuestros resultados de las precipitinas séricas frente a *P. aeruginosa*, nos permitieron discriminar el estado de colonización por *P. aeruginosa* intermitente vs infección crónica por esta bacteria. En nuestra cohorte un nivel de ppPA  $\geq 7$  comportaba un estado de colonización crónica con una sensibilidad del 64,6% y una especificidad del 100%.

Los resultados del estudio presente determinaron la existencia de una estrecha correlación entre el estado microbiológicamente definido de la colonización por *P. aeruginosa* y los anticuerpos en suero contra este microorganismo en nuestros pacientes con FQ. Esto confirma observaciones similares descritas por otros autores (160).

Brett y cols. (161) observaron niveles de anticuerpos más altos en la infección crónica por *P. aeruginosa* que en los pacientes con infección intermitente, con un solapamiento entre los dos grupos. Sin embargo, observaron niveles más elevados entre los pacientes infectados con cepas mucoides de *P. aeruginosa* que entre los pacientes que sólo mostraban *P. aeruginosa* planctónica.

Otro aspecto de gran importancia clínica, es el aumento de la sensibilidad diagnóstica que proporciona la determinación de precipitinas en suero. Burns y cols. (70) encuentra en su estudio que teniendo en cuenta exclusivamente el cultivo de esputo, se consideró que sólo el 45% de los pacientes estaban infectados, mientras que la detección de anticuerpos elevó este porcentaje al 97,5%. Li y cols. (102), observaron que las transiciones tanto desde la ausencia de *P. aeruginosa* a *P. aeruginosa* no mucoide y de *P. aeruginosa* no mucoide a *P. aeruginosa* mucoide llevaron a aumentos bruscos en los niveles de anticuerpos, lo que sugiere que la respuesta de anticuerpos se correlaciona estrechamente con las etapas de la infección por *P. aeruginosa*. Según algunos autores, parece que la inmunidad mediada por anticuerpos frente a la infección por *P. aeruginosa*, puede haberse especializado para defenderse contra este patógeno virulento y tuviese una memoria mejorada frente a las infecciones por *P. aeruginosa* recurrentes y graves (122). Por lo tanto, el aumento de los niveles de anticuerpos es el primer signo de infección por *P. aeruginosa* no mucoide y *P. aeruginosa* mucoide; es decir, niveles relativamente bajos de precipitinas indican infección por *P. aeruginosa* planctónica y títulos elevados indican infección por *P. aeruginosa* mucoide.

Nuestros resultados estuvieron en esa línea. Los niveles de precipitinas en los no infectados por *P. aeruginosa* eran imperceptibles, aumentaron ligeramente en la colonización intermitente, y posteriormente crecieron de forma paulatina tras el establecimiento de la infección crónica hasta alcanzar sus valores máximos con el desarrollo de la infección por cepas mucoides y mutirresistentes a los antibióticos.

Un aspecto de gran interés clínico son los hallazgos recientes que muestran que la evidencia serológica de *P. aeruginosa* puede predecir la infección en los pacientes con

FQ durante algún tiempo antes de producirse el crecimiento del microorganismo en las muestras respiratorias. En un estudio de 68 individuos con FQ identificados a través del cribado neonatal, se informó de que la seroconversión frente a *P. aeruginosa* precedió al aislamiento de la bacteria en los cultivos respiratorios entre 6 a 12 meses, y esta seroconversión se vio asociada con un empeoramiento clínico, funcional y en la puntuación de la radiografía de tórax (104).

Nuestros resultados de correlacionar las ppPA vs FEV<sub>1</sub>% como parámetro representativo del estado de la función pulmonar, evidenciaron una alta correlación negativa entre los niveles de precipitinas y el FEV<sub>1</sub>% del predicho, con una  $r = -0,65$ ;  $p < 0,0001$ . El estudio de las subpoblaciones de los pacientes colonizados, revela que esa correlación negativa se pierde en los pacientes con colonización por *P. aeruginosa* intermitente, es más débil,  $r = -0,31$  en los colonizados por cepas de *P. aeruginosa* no multirresistentes, y tiene una correlación negativa más acusada en los PAMR,  $r = -0,70$ ;  $p = 0,0003$ .

Los resultados de correlacionar el nivel de ppPA con el deterioro radiológico en la TAC medido a través del “score de Bhalla” en nuestros pacientes con una colonización crónica por *P. aeruginosa*, evidenció una asociación negativa con un valor de  $r = -0,46$ ;  $p < 0,001$ . Esta circunstancia viene a reflejar que el daño estructural del pulmón en los pacientes FQ medido con la TAC, era más severo a medida que aumentaba el nivel de precipitinas.

Un aspecto novedoso y de interés clínico en los resultados del presente trabajo, es el valor discriminatorio de las precipitinas para indicar qué pacientes están en riesgo de sufrir un evento de fallecimiento o necesidad de trasplante pulmonar. Nuestro resultados señalan que aquellos pacientes con una nivel de precipitinas de  $\geq 10$ , durante los dos últimos años, junto con un incremento anual de 1 unidad/año durante los dos últimos años, conlleva un 61% de probabilidad de desarrollar un evento de fallecimiento o necesidad de trasplante pulmonar (sensibilidad de 35,5%; especificidad del 87,7%). El perfil del paciente en nuestra cohorte que precisó de un trasplante pulmonar o falleció presentaba en un 66,7% la concurrencia de ppPA  $\geq 20$  y FEV<sub>1</sub>%  $\leq$

45%, o bien, que el 92,6% de los que sufrieron un evento de trasplante ó fallecieron presentaban precipitinas  $\geq 20$  y/o FEV<sub>1</sub>%  $\leq 45$ %.

No cabe duda de que, desde una perspectiva clínica, la determinación regular de anticuerpos séricos frente a *P. aeruginosa* puede ser útil en los pacientes con un estudio microbiológico negativo para *P. aeruginosa*. Si los niveles de anticuerpos se elevan en estas condiciones, existe una alta sospecha de infección por *P. aeruginosa* y se sugiere el uso de tratamiento de erradicación, incluso en ausencia de la detección microbiológica de *P. aeruginosa*. En la actualidad nuestra estrategia para la erradicación de *P. aeruginosa* se basa únicamente en la detección microbiológica del organismo. En el futuro, el inicio temprano y, posiblemente, la intensidad y la duración del tratamiento antipseudomónico puede ser determinado por los resultados de las pruebas de anticuerpos, pero serán necesarios más estudios longitudinales para demostrar su beneficio clínico.

## 7. Implicaciones clínicas.

En el presente estudio existen varios puntos de interés clínico. En primer lugar, el reconocimiento en nuestra cohorte de FQ de la existencia de un “periodo ventana” de 4,6 años de promedio entre el inicio de la colonización por *P. aeruginosa* y el establecimiento de la infección crónica, nos va a permitir establecer un tratamiento antibiótico precoz y agresivo, con la finalidad de evitar o retrasar el desarrollo de la infección crónica y por consiguiente mejorar su pronóstico. Segundo, la detección de los pacientes con FQ infectados por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes conlleva un cambio epidemiológico de gran interés clínico. Estos pacientes deben ser segregados del resto de pacientes con FQ para evitar las infecciones cruzadas, habida cuenta del riesgo potencial de su transmisión entre pacientes.

Los resultados de la sensibilidad antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa* en nuestra cohorte, nos indican que los antibióticos meropenem, colistina y tobramicina, constituyen a priori la mejor opción terapéutica frente a una exacerbación infecciosa

pulmonar. Asimismo, los datos de sensibilidad nos revelan que la colistina representa una magnífica opción para el tratamiento de mantenimiento de la infección crónica por *P. aeruginosa* en su formulación para inhalación.

La evaluación de los hallazgos del presente estudio respecto de las precipitinas séricas antipseudomonas, nos va a permitir su utilización como una herramienta diagnóstica a modo de biomarcador, que junto con los hallazgos microbiológicos en los cultivos de las secreciones broncopulmonares, nos ayude a una detección temprana de la colonización por *P. aeruginosa*. En todo caso, un valor de precipitinas  $\geq 7$  unidades, representa en nuestra cohorte de pacientes una señal de alarma y la necesidad de optimizar todas las medidas terapéuticas, teniendo en consideración que se trata de un factor de mal pronóstico, especialmente si en ese paciente en concreto se añade el hecho de ser homocigoto para la mutación F508del y/o estar coinfectado por *Aspergillus* spp.



## VII. CONCLUSIONES

---

- 1.** La prevalencia de la colonización-infección por *P. aeruginosa* aumentó durante el periodo de estudio, desde cifras iniciales del 40,2% en el año 1996 hasta alcanzar un 45,4% en el año 2014. Este aumento se originó principalmente por un incremento en la colonización crónica que pasó de un 20,7% a un 31,6%.
- 2.** La colonización inicial por *P. aeruginosa* se produjo en nuestra cohorte a la edad media de 14,5 años y la infección crónica se identificó a una edad media de 19,1 años. La infección crónica por *P. aeruginosa* tuvo una repercusión negativa en la función pulmonar, con una caída media en el FEV<sub>1</sub>% del 12,5%.
- 3.** Las tasas de resistencia antibiótica aumentaron en la práctica totalidad de los antibióticos antipseudomónicos testados durante el periodo de tiempo del estudio longitudinal, con la única excepción del antibiótico colistina.
- 4.** En el 42% de los pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa*, las cepas cumplían criterios de multirresistencia. Estos pacientes infectados por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes tenían peor función pulmonar, un número más elevado de exacerbaciones infecciosas y de ingresos hospitalarios que aquellos pacientes colonizados de forma intermitente o por cepas de *P. aeruginosa* sensibles.
- 5.** En el modelo multivariable final tres variables permanecían asociadas a un mayor riesgo de infección crónica por *P. aeruginosa*. Ser homocigoto para la mutación F508 del frente a ser heterocigoto; la coinfección por *Aspergillus* spp. y el nivel de precipitinas séricas frente a *P. aeruginosa*.

**6.** Un nivel de precipitinas frente a *P. aeruginosa*  $\geq 7$ , conlleva en nuestra cohorte a identificar en el paciente un estado de infección crónica por *P. aeruginosa* (sensibilidad 64,6%; especificidad del 100%).

**7.** Los pacientes con un nivel de precipitinas frente a *P. aeruginosa*  $\geq 10$  de forma mantenida, unido al incremento de 1 U/año en los últimos dos años, tenían un 61% de probabilidad de fallecer o de precisar un trasplante pulmonar.

## ABREVIATURAS

---

**A**     ATP: Adenosin Trifosfato

      Ampc: Adenosín monofosfato cíclico

      ADN: Ácido Desoxirribonucleico

      ARN: **Ácido Ribonucleico**

      ARNr: **Ácido Ribonucleico ribosómico**

      AMEs: enzimas modificadoras de los aminoglucósidos

      ANOVA: Análisis de la Varianza

      AP: Proteasa Alcalina

**B**     LBA: Lavado broncoalveolar

      BCC: *Burkholderia cepacia* complex

      BGNNF: Bacilo gram negativo no fermentador de la lactosa

      BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

**C**     ClNa: Cloruro de sodio

      CATs: Cloranfenicol acetiltransferasas

      Cl: Cloro

      CFF: Cystic Fibrosis Foundation de los EE.UU.

      CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulador

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CIE: Inmunoelectroforesis Cruzada

**D** DE: Desviación estándar

**E** EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance System  
(Sistema Europeo de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos)

EEUU: Estados Unidos de América

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

E-test: Epsilon test

ExoA: Exotoxina A

ELA: Elastasa

ERV: *Enterococcus* resistente a la vancomicina

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática

Efflux pump: Bomba de expulsión

**F** F508del: Delección de la fenilalanina en el codón 508

FEV<sub>1</sub>: Volumen de gas espirado en el primer segundo de la espiración forzada

FVC: Capacidad vital forzada

FQ: Fibrosis quística

- H** Hib: *H.influenzae* tipo b
- HiNT: *H. influenzae* no tipificable
- I** IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%
- IMC: Índice Masa Corporal
- IP: Insuficiencia pancreática
- L** LMC: Limpieza mucociliar
- LSA: Liquido superficie aérea
- LPC: Liquido periciliar
- M** MFS: Major facilitator superfamily (superfamilia transportadora principal)
- MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización por láser asistida por matriz) - analizador Time of Flight (tiempo de vuelo).
- MDR: Proteínas de resistencia a fármacos
- N** Na<sup>+</sup>: Sodio
- NBD: Nucleotide Binding Domain

- O** OMS: Organización Mundial de la Salud
- OprD: Gen de la porina D bacteriana
- P** PBPs: Penicillin Binding Proteins (proteínas de unión a la penicilina)
- PAMR: *Pseudomonas aeruginosa* Multirresistente
- ppPA: Precipitinas frente a *P. aeruginosa*
- PAI: *Pseudomonas aeruginosa* intermitente
- PAS: *Pseudomonas aeruginosa* sensible
- Q** QS: Quórum Sensing (detección de quórum)
- QO<sub>2</sub>: Consumo de oxígeno
- R** RIA: Radioinmunoanálisis
- RND: Resistance nodulation-cell división  
(bombas de resistencia que modulan la división celular)
- ROC (Curva ROC): Receiver Operating Characteristic  
(Característica Operativa del Receptor)
- Rx: Radiografía
- S** SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina
- SCVs: Small colony variants
- SPSS: Statistical Product and Service Solutions

St-Ag:1-17: Antígenos estándar frente serotipos 1-17 *P. aeruginosa*

Spp: Especie

**T** TAC: Tomografía Axial Computarizada

TNF $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$

**U** UFC/ml: Unidades formadoras de colonias por ml de muestra

UPV/EHU: Universidad País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea

**V** vo: Vía oral

VITEK: Sistema identificación microbiana



## PATRÓN DE COLORES

---

-  *P. aeruginosa* multirresistente (PAMR)
-  *P. aeruginosa* sensible (PAS)
-  *P. aeruginosa* intermitente (PAI)
-  Sin *P. aeruginosa*
-  Trasplantados
-  Fallecidos
-  *P. aeruginosa* colonizado
-  *P. aeruginosa* planctónica
-  Colonización crónica
-  *P. aeruginosa* mucoide



## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:448–454.
2. Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8822–8828.
3. Henry RL, Mellis CM, Petrovic L. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1992;12(3): 158–61.
4. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1997;23(5):330–335.
5. Doring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS, Consensus Study G. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *J Cyst Fibros* 2012;11:461–479.
6. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; 361-681.
7. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 352-1992-2001
8. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168-918.
9. Cystic Fibrosis Foundation Annual Patient Registry Report, 2014. Available from the Cystic Fibrosis Foundation, at: <http://www.cff.org/>
10. Sweezey NB, Ratjen F. The cystic fibrosis gender gap: potential roles of estrogen. *Pediatr Pulmonol* 2014; 49-309-317
11. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *Am J Dis Child* 1938;56: 344-399.

12. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
13. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 1989; 245(4922): 1059-1065.
14. Knowlton RG, Cohen-Haguener O, Van Cong N, Frezal J, Brown V A, Barker D et al. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 1985; 318: 380-382.
15. Gilbert A, Jadot M, Leontieva E, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R. Delta F508 CFTR localizes in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in cystic fibrosis cells. *Exp Cell Res* 1998; 242: 144-152.
16. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983; 301: 421-422.
17. Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H et al. Immunocytochemical localisation of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9262-9266.
18. Di Sant' Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 1953; 12: 549-563.
19. Accurso FJ, Sontag MK, Wagener JS. Complications associated with symptomatic diagnosis in infants with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2005; 147: S37.
20. Gilljam M, Ellis L, Corey M, Zielenski J, Durie P, Tullis DE. Clinical manifestations of cystic fibrosis among patients with diagnosis in adulthood. *Chest* 2004; 126: 1215-1224
21. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 194-222.
22. Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest* 2004; 125: 1S.

- 23.** Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9:498-503
- 24.** Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998; 132:589-595
- 25.** Travis SM, Singh PK, Welsh MJ. Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 89-95.
- 26.** Paradiso AM, Ribeiro CM, Boucher RC. Polarized signaling via purinoceptors in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J Gen Physiol* 2001. 117: 53-67.
- 27.** Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, Espiritu C, Conway BD, Greenberg EP et al. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun* 2000; 68: 2748-2755.
- 28.** Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, Macek M Jr, Zemkova D, Vavrova V. Association of tumour necrosis factor alpha variants with the CF pulmonary phenotype. *Thorax* 2005; 60:320.
- 29.** Guggino WB. Cystic fibrosis and the salt controversy. *Cell* 1999; 96:607-610
- 30.** Griese M, Kappler M, Gaggar A, Hartl D. Inhibition of airway proteases in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2008; 32:783-795
- 31.** Heeckeren A, Walenga R, Konstan MW, et al. Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Invest* 1997; 100:2810-2815
- 32.** Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC. et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002; 109:317-325.
- 33.** Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med* 2012; 18:509-519
- 34.** Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(2):299–323.

35. Zhao J, Schloss PD, Kalikin LM, Carmody LA, Foster BK, Petrosino JF et al. Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 Apr 10;109(15): 5809–5814.
36. Andersen DH. Therapy and prognosis of fibrocystic disease of the pancreas. *Pediatrics* 1949; 3: 406-417.
37. Foster TJ. Immune evasion by *staphylococci*. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 948-958.
38. Stutman HR, Lieberman JM, Nussbaum E, Marks MI. Antibiotic prophylaxis in infants and young children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial. *J Pediatr* 2002; 140: 299-305.
39. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 168-172
40. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995;269:496-512
41. Bilton D, Pye A, Johnson MM, Mitchell JL, Dodd M, Webb AK, et al. The isolation and characterization of non-typeable *Haemophilus influenzae* from the sputum of adult cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 1995; 8: 948-953.
42. Doring G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 2004; 3: 67-91.
43. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 1188-1200.
44. Thomassen MJ, Demko CA, Klinger JD, Stern RC. *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis. A new opportunist. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 791-796.
45. Kalish LA, Waltz DA, Dovey M, Potter-Bynoe G, McAdam AJ, Lipuma JJ et al. Impact of *Burkholderia dolosa* on lung function and survival in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 421-425.

46. Corey M, Farewell V. Determinants of mortality from cystic fibrosis in Canada, 1970-1989. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 1007-1017.
47. Chen JS, Witzmann KA, Spilker T, Fink RJ, LiPuma JJ. Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. *J. Pediatr* 2001; 139:643–649.
48. Govan, J. R. W., C. J. Doherty, J. W. Nelson, P. H. Brown, A. P. Greening, J. Maddison, M. Dodd, and A. K. Webb.. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 1993;342:15–19.
49. Ledson MJ, Gallagher MJ, Jackson M, Hart CA, Walshaw MJ. Outcome of *Burkholderia cepacia* colonisation in an adult cystic fibrosis centre. *Thorax* 2002; 57: 142-145.
50. Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev* 2004; 17:57–71.
51. Murray TS, Kazmierczak BI. Chronic vs acute *Pseudomonas aeruginosa* infection states. In: Vasil M, Darwin A, editors. Regulation of bacterial virulence. Washington, DC: ASM Press; 2013. p. 21–39.
52. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406: 959-964.
53. Cardo D, Horan T, Andrus M, Dembinski M, Edwards J, Peavy G et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32: 470-485.
54. Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 1970; 104: 313-322.
55. Schauder S, Bassler BL. The languages of bacteria. *Genes Dev* 2001; 15: 1468-1480
56. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-138.

57. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002; 184: 1140-1154.
58. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000; 407: 762-764.
59. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 114-122.
60. Wright C, Kominos SD, Yee RB. *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31: 453-454.
61. Ratjen F, Döring G, Nikolaizik WH. Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 2001; 358: 983-984.
62. Rivas Caldas R, Boisramé S. Upper aero-digestive contamination by *Pseudomonas aeruginosa* and implications in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros* 2015;14:6-15
63. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2011;24(1):29-70
64. Pedersen SS, Hoiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* 1992; 47: 6-13.
65. Høiby N, Frederiksen B. Microbiology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes D, eds. *Cystic fibrosis*. 2nd ed. London: Arnold, 2000: 83–107.
66. Høiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* 2001; 3:23-35.
67. Döring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Høiby N, Smyth A et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000; 16:749–767.

68. Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl 1977;262C:1–96.
69. Frederiksen B, Lanng S, Koch C, Høiby N. Improved survival in the Danish cystic fibrosis centre: results of aggressive treatment. Pediatr Pulmonol 1996;21:153–158.
70. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yin D, Emerson J, Rosenfeld M, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. J Infect Dis 2001;183:444–452.
71. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Slieker MG, Terheggen-Lagro SW, van Berkhout FT, Kimpen JL, et al. Diagnostic value of serological test against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. Thorax 2006;61:689–693.
72. Winnie GB, Cowan RG. Respiratory tract colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: correlations between anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody levels and pulmonary function. Pediatr Pulmonol 1991;10:92–100.
73. Hayes Jr D, Farrell PM, Li Z, West SE. *Pseudomonas aeruginosa* serological analysis in young children with cystic fibrosis diagnosed through newborn screening. Pediatr Pulmonol 2010;45(1):55–61.
74. Philip D, Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clin Microbiol Rev 2009;22 (4):582-610.
75. Sherertz RJ, Reagan DR, Hampton KD, Robertson KL, Streed SA, Hoen HM, et al. A cloud adult: the *Staphylococcus aureus*-virus interaction revisited. Ann Intern Med 1996;124:539–547.
76. Adcock PM, Pastor P, Medley F, Patterson JE, Murphy TV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two child care centers. J Infect Dis 1998; 178:577–580.
77. Ferber D. Antibiotic resistance. Superbugs on the hoof? Science 2000; 288:792–794.

78. Jacobs C, Joris B, Jamin M, Klarsov K, Van Beeumen J, Mengin-Lecreux D, et al. AmpD, essential for both  $\beta$ -lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol Microbiol* 1995;15:553–559.
79. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:577–585.
80. Rice LB, Carias LL, Hutton-Thomas R, Sifaoui F, Gutmann L, Rudin SD. Penicillin-binding protein 5 and expression of ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1480–1486.
81. Willey JM: Prescott, Harley, & Klein's Microbiology, 7th edition. McGraw-Hill, 2008: 852
82. Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, Pialoux G, Collatz E, Gutmann L. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high level resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1093–1098.
83. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 2002;419:587–593.
84. Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs* 2009;69:1879–1901.
85. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:43-48
86. Gilbert DN, Guidos RJ, Boucher HW, Talbot GH, Spellberg B, Edwards JE, et al. The 10X20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New antibacterial Drugs by 2020. *Clin Infect Dis*. 2010;50:1081-1083
87. Falagas ME, Kolesti PK, Bliziotis LA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. 2006; 55:1619-1629

88. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:6349–6357.
89. Dimatatac EL, Alejandria MM, Montalban C, Pineda C, Ang C, Delino R. Clinical outcomes and costs of care of antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Microbiol Infect Dis*. 2003;32:159–167
90. Fernandez L, Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:661–681.
91. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in . *Clin Infect Dis* 2002; 34: 634-640
92. Morrison AJ, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1984; 6 (Suppl 3):S627–S642.
93. Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Fancioli P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:242–247.
94. Lieberman D, Lieberman D. *Pseudomonas* infections in patients with COPD: epidemiology and management. *Am J Respir Med* 2003;2:459-468
95. Macia MD, Blanquer D, Tagores B, Saulea J, Perez JL, Oliver A. Hipermutacion is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3382-3386
96. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331: 637-642.

97. Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2003;2(1):29–34.
98. Alarcón T, Caballero T, Cantón R, Oliver A. Diagnóstico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. En: Cercenado E, Cantón R, eds. *Procedimientos en microbiología clínica*, cap.28. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2007. Disponible en [<http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiología/seimc-procedimientomicrobiología28.pdf>]
99. Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, et al. DNA-base diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genovars I and III. *J Clin Microbiol* 2000; 38; 3165-73
100. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. Vol. 29, No. 3. 2009.
101. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966, 45: 493.
102. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SEH, Green CG, et al. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* 2005;293:581–588.
103. Thomassen MJ, Klinger JD, Badger SJ, van Heeckeren DW, Stern RC. Cultures of thoracotomy specimens confirm usefulness of sputum cultures in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1984;104:352–356.
104. West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, et al. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA* 2002;287:2958–2967.

- 105.** Høiby N, Flensburg EW, Beck B, Friis B, Jacobsen SV, Jacobsen L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. *Scand J Respir Dis* 1977; 58:65–79.
- 106.** Clopper CJ, Pearson ES. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika*. 1934;26:404-413.
- 107.** Hosmer DW, Lemeshow S. “A goodness-of-fit test for the multiple logistic regression model.” *Communications in Statistics*. 1980; A10:1043-1069.
- 108.** Rosenfeld M, Emerson J, McNamara S, Thompson V, Ramsey BW, Morgan W, et al. Risk factors for age at initial *Pseudomonas* acquisition in the cystic fibrosis epic observational cohort. *J Cyst Fibros*. 2012;11(5):446–453.
- 109.** Psoter KJ, Rosenfeld M, De Roos AJ, Mayer JD, Wakefield J. Differential Geographical Risk of Initial *Pseudomonas aeruginosa* Acquisition in Young US Children With Cystic Fibrosis. *Am J Epidemiol*. 2014;179(12):1503–1513
- 110.** Brett MM, Simmonds EJ, Ghoneim ATM, Littlewood JM. The value of serum IgG titres against *Pseudomonas aeruginosa* in the management of early pseudomonal infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1992;67:1086–1088.
- 111.** Bhalla M, Turcios N, Aponte V, Jenkins M, Leitman BS, Mccauley DI, et al. Cystic-fibrosis scoring system with thin-section CT. *Radiology* 1991;179:783-788
- 112.** López-Causapé C, Rojo-Molinero E, Mulet X, Cabot G, Moya B, Figuerola J, et al. Clonal dissemination, emergence of mutator lineages and antibiotic resistance evolution in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis chronic lung infection. *PLoS One* 8:e71001.
- 113.** Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest* 2009;136:1554–1560.
- 114.** Cystic Fibrosis Canada. The Canadian Cystic Fibrosis Registry 2012 annual report; 2014 [Available at: <http://www.cysticfibrosis.ca/wp-content/uploads/2014/03/Canadian-CF-Registry-English-FINAL-FOR-WEB1.pdf>].

- 115.** Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griese M, Lang T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis Thorax 2006;61:684–688.
- 116.** Knapp EA, Salsgiver E, Fink A, Sewall A, Marshall BC, Saiman L. Trends in respiratory microbiology of people with cystic fibrosis in the united states, 2006–2012. Pediatr Pulmonol. 2014;49(S38):317.
- 117.** Crull MR, RamosKJ, Caldwell E, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Goss CH. Change in *Pseudomonas aeruginosa* prevalence in cystic fibrosis adults over time. BMC Pulmonary Medicine 2016;16:176-182
- 118.** Lee TWR, Brownlee KG, Denton M, Littlewood JM, Conway SP. Reduction in prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection at a regional pediatric cystic fibrosis center. Pediatr Pulmonol. 2004;37(2):104–110.
- 119.** Brennan AL, Geddes DM. Cystic fibrosis. Curr Opin Infect Dis 2002;15:175–82.
- 120.** Vishwanath S, Ramphal R. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tracheobronchial mucin. Infect Immun. 1984;45(1):197-202
- 121.** Chotirmall SH, Smith SG, Gunaratnam C, Cosgrove S, Dimitrov BD, O'Neill SJ, et al. Effect of estrogen on *pseudomonas* mucoidy and exacerbations in cystic fibrosis. N Engl J Med 2012;366:1978-1986.
- 122.** Doring G, Albus A, Hoiby N. Immunological aspects of cystic fibrosis. Chest. 1988;94:109S-115S
- 123.** Ballmann M, Rabsch P, von der Hardt H. Longterm follow up of changes in FEV1 and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. Thorax. 1998;53:732-737.
- 124.** Henry RL, Mellis CM, Petrovic L. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 1992;12:158-161
- 125.** Hansen CR, Pressler T, Høiby N. Early aggressive eradication therapy for intermittent *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience. J Cyst Fibros. 2008;7(6):523–530.

- 126.** Parad RB, Gerard CJ, Zurakowski D, Nichols DP, Pier GB. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect Immun.* 1999;67:4744-4750.
- 127.** Smith AL. Antibiotic therapy: efficacy and assessment. In: Sturgess JM, ed. Proceedings of the 8th International Cystic Fibrosis Congress, Toronto, Canada, 26–30 May 1980. 1980:382.
- 128.** Shand GH, Pedersen SS, Tilling R, Brown MRW, Hoiby N. Use of immunoblot detection of serum antibodies in the diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 1988; 27:169–177.
- 129.** Speert DP, Farmer SW, Campbell ME, Musser JM, Selander RK, Kuo S. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to the phenotype characteristic of strains from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28:188–194.
- 130.** Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:35–51.
- 131.** Pitt TL, Sparrow M, Warner M, Stefanidou M. 2003. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* 58:794–796.
- 132.** Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D’Argenio DA, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 103:8487–8492.
- 133.** Gallego Rodrigo M, Baranda García F, Urrea Zalbidegoitia E, Larrea Ayo M, Pijoan Zubizarreta JI, Gomez Bonilla A, Vazquez Cordero C. Situación actual de la resistencia y multirresistencia antibiótica en pacientes con fibrosis quística colonizados crónicamente por *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Bronconeumol* 2016;52 Supl C1:290-300
- 134.** Al-Aloul M, Crawley J, Winstanley C, Hart CA, Ledson MJ, Walshaw MJ. Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax* 2004; 59:334–336.
- 135.** Lechtzin N, John M, Irizarry R, Merlo C, Diette GB, Boyle MP. Outcomes of adults with cystic fibrosis infected with antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiration* 2006; 73:27–33

- 136.** Aaron SD. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis - a nasty bug gets nastier. *Respiration* 2006; 73:16–17.
- 137.** Hadjiliadis D, Steele MP, Chaparro C, Singer LG, Waddell TK, Hutcheon MA, et al. Survival of lung transplant patients with cystic fibrosis harboring panresistant bacteria other than *Burkholderia cepacia*, compared with patients harboring sensitive bacteria. *J. Heart Lung Transplant* 2007; 26:834–838.
- 138.** Mustafa MH, Chalhoub H, Denis O, Deplano A, Vergison A, Rodriguez-Villalobos H, et al. Antimicrobial Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Cystic Fibrosis Patients in Northern Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:6735-6741
- 139.** Cystic Fibrosis Foundation, Borowitz D, Robinson KA, Rosenfeld M, Davis SD, Sabadosa KA, Spear SL, et al. Cystic Fibrosis Foundation evidence-based guidelines for management of infants with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 2009; 155(6 Suppl):S73-93
- 140.** Levy H, Kalish LA, Cannon CL, Garcia KC, Gerard C, Goldmann D, et al. Predictors of Mucoic *Pseudomonas* Colonization in Cystic Fibrosis Patients. *Pediatr Pulmonol.* 2008;43(5):463–471.
- 141.** Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, Kronmal RA, Konstan MW, Burns JL, et al. Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *Am J Crit Care Med* 2007;175:822–828.
- 142.** Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, et al. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros* 2012;11:363–382.
- 143.** Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Relationship between mucoid strains of *P. aeruginosa* and the humoral immune response. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 1974;82(4):551–558.
- 144.** Brett MM, Ghoneim ATM, Littlewood JM. Prediction and diagnosis of early infection in cystic fibrosis: a follow-up study. *J Clin Microbiol* 1988;26:1565–70.
- 145.** Pressler T, Karpati F, Granstrom M, Knudsen PK, Lindbald A, Hjelte L, et al. Scandinavian CF Study Consortium. Diagnostic significance of measurements of specific IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* by three different serological methods. *J Cyst Fibros* 2009(8):37–42.

- 146.** de Vrankrijker AM, Van Der Ent CK, Van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJ, Bonten MJ, et al. *A. fumigatus* colonisation in cystic fibrosis: implications for lung function? Clin Microbiol Infect 2011;17:1381–1386.
- 147.** Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, et al. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. Clin Infect Dis 1998;27:158–163.
- 148.** Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *A. fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. Chest 2010;137:171–176.
- 149.** Jubin V, Ranque S, Stremler Le Bel N, Sarles J, Dubus JC. Risk factors for *Aspergillus* spp. colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2010;45:764–771.
- 150.** Wilmott, R. W., S. L. Tyson, and D. J. Matthew. 1985. Cystic fibrosis survival rates. The influences of allergy and *Pseudomonas aeruginosa*. Am. J. Dis. Child. 139:669–671.
- 151.** Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. J. Pediatr 1993; 122:854–860.
- 152.** Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, Pasta DJ, Craib ML, Silva SJ, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. J. Pediatr 2007; 151:134–139.
- 153.** Abman SH, Ogle JW, Harbeck RJ, Butler-Simon N, Hammond KB, Accurso FJ. Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. J. Pediatr 1991; 119:211–217.
- 154.** Schaedel C., de Monestrol I, Hjelte L, Johannesson M, Kornfalt R, Lindblad A, et al. Predictors of deterioration of lung function in cystic fibrosis. Pediatr. Pulmonol 2002; 33:483–491.
- 155.** Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. Pediatr. Pulmonol 2002; 34:91–100.

- 156.** Pressler T, Frederiksen B, Skov M, Garred P, Koch C, Hoiby N. Early rise of anti-*Pseudomonas* antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection - a case control study. *J. Cyst. Fibros* 2006; 5:9-15.
- 157.** Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Clin. Epidemiol* 1995; 48: 1041–1049.
- 158.** Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F, Armstrong D, Castile R, Greenwood K, et al. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1999; 28:321–328.
- 159.** Da Silva Filho LVF, Ferreira FA, Reis FJC, Britto MCAM, Levy CE, Clark O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis and treatment. *J Bras Pneumol* 2013;39(4):495–512.
- 160.** Hollsing AE, Granstrom M, Vasil ML, Wretlind B, Strandvik B. Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *J Clin. Microbiol* 1987;25:1868–1874.
- 161.** Brett MM, Ghoneim ATM, Littlewood JM. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1986;61:1114–1120.