



Aspectos microbiológicos de las bronquiectasias. El problema de la *Pseudomonas aeruginosa*

RAFAEL CANTÓN MORENO, ELIA GÓMEZ G. DE LA PEDROSA Y ANA FERNÁNDEZ-OLMOS

Introducción

Las bronquiectasias (BQ), definidas como una dilatación irreversible de la vía aérea con destrucción de la pared bronquial, suelen producirse de forma progresiva y su inicio no siempre es bien conocido. Entre las causas que desencadenan esta enfermedad se han señalado las infecciones respiratorias previas durante la infancia, alteraciones congénitas y diferentes inmunodeficiencias, sin descartar las causas iatrogénicas¹⁻³. En el pulmón del paciente con BQ se crea un nicho ecológico ideal para la colonización bacteriana por microorganismos potencialmente patógenos (MPP) similar a los que se encuentran en el pacientes adultos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en los niños con bronquitis bacteriana persistente y, en cierto modo, en la fibrosis quística (FQ)⁴⁻⁶. Los MPP persisten a lo largo del tiempo, incrementan su número durante las exacerbaciones y es difícil erradicarlos con el tratamiento con antimicrobianos. Durante la infancia, *H. influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* son los patógenos más importantes y

en mucha menor frecuencia *Staphylococcus aureus*⁷. *Pseudomonas aeruginosa* junto a *H. influenzae* son los microorganismos que en mayor proporción se aíslan en los paciente adultos⁸⁻¹². En algunos pacientes la colonización de la superficie mucosa afectada es polimicrobiana y es posible encontrar más de un MPP⁸.

En el presente capítulo analizamos, desde una perspectiva microbiológica, las condiciones idóneas del hábitat que se producen en los pacientes con BQ y que favorecen el crecimiento de los MPP, el efecto inflamatorio que generan estos microorganismos, su crecimiento en biopelículas y las consecuencias para el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. Asimismo se definen criterios para el estudio microbiológico, incluyendo la determinación de la sensibilidad de los microorganismos aislados. Dada la importancia creciente de *P. aeruginosa* en los pacientes con BQ se prestará especial atención a este microorganismo y su importancia en el deterioro de la función pulmonar.

Causas etiológicas microbianas de las bronquiectasias

Desde un punto de vista anatómico y según la región del árbol bronquial afectada, las BQ se clasifican en localizadas y difusas. Clásicamente, las primeras se han relacionado con infecciones previas como sarampión, tosferina, tuberculosis y aspergilosis pulmonar, mientras que las difusas podrían estar relacionadas con otras causas que generan un deterioro progresivo de la función pulmonar y favorecen una posterior colonización bacteriana. Entre estas se han destacado las alteraciones congénitas como la discinesia ciliar primaria o la propia FQ, las inmunodeficiencias primarias (hipogammaglobulinemia) o secundarias (leucemia, postrasplante, etc.), las causas iatrogénicas por inhalación de tóxicos o la artritis reumatoide. No obstante no debería descartarse la posibilidad de múltiples causas. Asimismo, también se incluyen los pacientes con EPOC que pueden, con independencia de la alteración del tejido pulmonar y origen, presentar dilatación de la vía aérea. Igualmente, debería realizarse un seguimiento exhaustivo de los niños con bronquitis bacteriana persistente.

Actualmente, se explica el proceso de dilatación de la vía aérea como consecuencia de la acumulación de una serie de factores que constituyen un círculo vicioso. Incluye la alteración de los mecanismos de defensa locales que favorecen la colonización e infección de la vía respiratoria con la consecuente liberación de mediadores inflamatorios que provoca una distorsión de la pared bronquial y la secreción de moco que además de obstruir la vía aérea constituye un nicho con condiciones idóneas para la colonización de la mucosa por diferentes microorganismos. Así se mantiene el estímulo de inflamación, la colonización bacteriana y la deformación bronquial³.

Diferentes trabajos en los que sus autores tratan de demostrar las causas etiológicas de las BQ señalan que el haber padecido infecciones respiratorias fre-

cuentes durante la infancia constituye un factor predisponente para esta enfermedad. Entre estas infecciones destacan las producidas por *Aspergillus spp.*, *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium tuberculosis complex* y *Mycoplasma spp.* También se incluyen infecciones agudas que pueden lesionar el epitelio respiratorio como *Bordetella pertussis* y las producidas por virus respiratorios como sarampión, adenovirus o gripe y el virus respiratorio sincitial (VRS). No obstante, no está bien definido su papel en el proceso que desencadena las BQ y podrían ser un factor coadyuvante del mismo¹³⁻¹⁶.

En la actualidad, la disminución en la incidencia de algunas de estas infecciones, debido a la mejora de las condiciones sanitarias y a los programas de vacunación, sumado a la carencia de estudios sobre la etiología de las BQ en las épocas previas a la implantación de estos programas parece subestimar estos factores como causa etiológica en favor de una etiología idiopática^{7,16}.

Algunos estudios se han diseñado con el objetivo de establecer las causas microbiológicas que podrían estar implicadas en el desarrollo de las BQ tanto en la población adulta como en la pediátrica. La mayoría de ellos se han realizado retrospectivamente con revisión de historias clínicas y mediante estudios serológicos que demostrasen exposiciones previas a diferentes microorganismos. Otros trabajos han realizado un seguimiento en el tiempo aunque tienen el inconveniente de iniciar el estudio microbiológico una vez diagnosticadas las BQ^{7,17}, por lo que carecen de una perspectiva previa que permita establecer realmente las causas etiológicas de las lesiones.

El nicho ecológico, un lugar idóneo para el crecimiento de los microorganismos potencialmente patógenos

En el pulmón del paciente con BQ, el moco que recubre la superficie mucosa se encuentra secretado en

exceso, se acumula en “fondos de saco” y es escasamente expulsado por el movimiento ciliar hacia las vías respiratorias altas. Por este motivo, los microorganismos que ingresan en el área bronquiectática quedan atrapados en la mucosa respiratoria sin posibilidad de ser eliminados eficientemente. En estas condiciones y con independencia del estímulo inflamatorio continuo, se crean áreas con baja tensión de oxígeno en las que se favorece el crecimiento en biopelículas de los microorganismos, dificultándose aún más su eliminación. Es previsible que en estas condiciones se produzcan situaciones de estrés que favorezcan la formación de variantes antigénicas que entorpezcan la labor ejercida por el sistema inmunológico y procesos de hipermutación que conllevan una mayor probabilidad de formación de mutantes resistentes y su selección durante el tratamiento antimicrobiano. Además, la llegada de los antimicrobianos estaría dificultada y por tanto se reduce su eficacia clínica. Uno de los microorganismos en los que más se han estudiado estos dos hechos es *P. aeruginosa* aunque existen indicios claros de que con otros MPP, incluyendo *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *S. aureus* podrían también formar biopelículas en el lecho bronquiectático y presentar fenómenos de hipermutación.

Colonización, infección e inflamación en el paciente con bronquiectasias

El desarrollo de los MMP en los pacientes con BQ se produce en la superficie de la mucosa respiratoria sin invadir los tejidos adyacentes. Suelen ocupar una superficie mucosa que puede estar limitada al área bronquiectática. Este proceso, al igual que el que se produce en los pacientes con EPOC, FQ y probablemente en los niños con bronquitis bacteriana persistente da lugar a una situación que habitualmente se denomina como de “patogénesis pasiva”⁵. El elevado inoculo bacteriano que normalmente alcanzan los microorganismos en esta localización y el proceso crónico de colonización es capaz de provocar un efecto

inflamatorio sin necesidad de que se produzca una agresión directa. Asimismo, los microorganismos liberan productos patogénicos y debido a la prolongada permanencia de las bacterias en la superficie mucosa se generan variantes de mayor virulencia que serían, al igual que en el bronquítico crónico, responsables parciales de las exacerbaciones^{4,8}. La diferenciación entre colonización e infección es complicada y es preferible referirse a la persistencia bacteriana como “colonización patogénica”.

Como se ha señalado en los pacientes con BQ se produce un círculo vicioso que comienza con una invasión de la mucosa respiratoria y un sobrecrecimiento con colonización patogénica que determina un estado de inflamación crónica que conduce a un daño tisular. Durante este proceso se desencadena un reclutamiento masivo de células inflamatorias, esencialmente neutrófilos y una elevada síntesis de NF- κ B o factor de transcripción nuclear. Una vez activado este factor se incrementa la síntesis de mediadores proinflamatorios entre los que destacan diferentes interleucinas (IL) (IL-1 β , IL-6 e IL-8), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Esta hiperrespuesta inflamatoria se refuerza con una deficiencia parcial de mediadores antiinflamatorios secundaria a una menor síntesis de IL-10 y de óxido nítrico que dan lugar a su vez a una menor actividad del inhibidor de la proteína κ (IKK- β). Algunos de estos procesos son más conocidos en el paciente con FQ o con EPOC pero el modelo inflamatorio en las BQ no tiene por qué diferir del que acontece en los anteriores^{8,18-20}. Algunos de los factores que disparan este proceso inflamatorio han sido identificados aunque no explican la totalidad de eventos y la situación de cada paciente². Tampoco está claro si estos actúan como coadyuvantes y son los propios MPP los que generan esta situación.

En los pacientes con EPOC se ha demostrado que durante las exacerbaciones se produce un claro aumento de los neutrófilos aunque también se ha observado el aumento de eosinófilos, incluso en los pacientes

con afectación leve²¹. Asimismo, los individuos con historia frecuente de exacerbaciones suelen presentar una mayor elevación de los marcadores de la inflamación, incluidos los períodos en fase estable. Este hecho podría ser responsable de la mayor propensión de estos pacientes a que se desencadenen exacerbaciones²² y que estas fuesen iniciadas por otros estímulos como la infección por agentes víricos o por patógenos clásicos.

Tanto en los pacientes adultos como en los niños con BQ se ha comprobado que el aumento de los neutrófilos y de los mediadores de la inflamación (IL-8) en las secreciones respiratorias se relaciona con la elevación del volumen de esputo y la superficie bronquiectásica afectada^{18,23,24}. Este aumento también se relaciona con el incremento del inóculo bacteriano que suele coincidir con las exacerbaciones. Recientemente se ha confirmado que el aumento detectado de TNF- α en los pacientes con EPOC en las secreciones respiratorias también tendría un papel esencial en el reclutamiento de los neutrófilos. TNF- α , junto con otros mediadores de la inflamación, estimula la producción de IL-8 e IL-6 pero también es capaz de incrementar la producción de ICAM-1 en las células epiteliales de la superficie bronquial. ICAM-1, es una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas que actúa en el reclutamiento de los neutrófilos y en su adhesión a las células epiteliales dañadas. Nuevamente se produce un círculo vicioso en el que la inflamación afecta al tejido epitelial con lo que se facilita el acúmulo de neutrófilos que favorecen a través de las elastasas el daño epitelial y la liberación de productos proinflamatorios²⁵.

En algunos estudios se ha encontrado una elevación de las concentraciones de radicales libres en aire exhalado, como el peróxido de hidrógeno, 8-isoprostano, el monóxido de carbono y el óxido nítrico, aunque en otros los resultados son discordantes²⁶⁻²⁸.

Tomando como modelo a los pacientes con EPOC, además de los efectos inflamatorios locales descritos con anterioridad, también se han detectado alteracio-

nes sistémicas de los mediadores de la inflamación²⁹. Se ha demostrado que durante las exacerbaciones se produce un aumento de la proteína C-reactiva (PCR), la IL-6 o el fibrinógeno del plasma, disminuyendo con la resolución del episodio. Estos parámetros están casi inalterados en los períodos entre las exacerbaciones. Entre todos ellos, el incremento sistémico de la PCR parece ser el parámetro que mejor se correlaciona con los períodos de exacerbación y que podría utilizarse para el seguimiento de los pacientes y la predicción de posibles exacerbaciones³⁰. De manera específica en los pacientes con BQ, el aumento de los marcadores sistémicos de la inflamación se correlaciona con el deterioro de la función pulmonar³¹.

Asimismo, y tomando como modelo los pacientes con EPOC, se ha detectado que durante las exacerbaciones se produce un aumento de los marcadores de la inflamación en el tracto respiratorio superior, aumentan los síntomas nasales³⁰. En muchos casos podría estar provocado por una colonización nasal por rinovirus que podrían desencadenar efectos inflamatorios tanto locales como a nivel del tracto respiratorio inferior. En este sentido, los pacientes con hipogammaglobulinemia, especialmente aquellos relacionados con la IgG o los subtipos de ella, suelen presentar rinosinusitis recurrente e infecciones respiratorias de repetición³². Puede ser diagnosticada mediante la medición de los niveles séricos de IgG y de sus subtipos y su comparación con los de IgM e IgA. Los niveles de IgG son menores a 5 g/L y los de IgA menores de 0,1 g/L. También puede documentarse midiendo la respuesta de anticuerpos frente a diferentes vacunas como la del tétano, difteria, sarampión, paperas y la de *S. pneumoniae*^{19,32,33,34,35}.

Microorganismos potencialmente patógenos en las bronquiectasias

En el cultivo de esputo de cualquier paciente con infección del tracto respiratorio inferior, incluyendo los

pacientes con BQ, es frecuente el aislamiento de microorganismos no patógenos que forman parte de la microbiota habitual del tracto respiratorio superior y que "contaminan" el esputo durante su eliminación. Entre ellos se incluye los estreptococos del grupo viridans, las corinebacterias, las neiserias en incluso diferentes especies de levaduras⁹. Junto a ellos, es posible cultivar otros microorganismos que si bien se consideran patógenos en el tracto respiratorio inferior pueden formar parte de manera transitoria de la microbiota del tracto respiratorio superior. Estos microorganismos han recibido el sobrenombre de "potencialmente patógenos" ya que su aislamiento ha de valorarse en función de la situación clínica del paciente y la muestra analizada.

Como se mencionó anteriormente, en el árbol bronquial del paciente con BQ se crea un nicho ecológico ideal para la colonización de la mucosa por MPP y que pueden ser causantes de exacerbaciones de forma similar a los que se encuentran en el paciente con EPOC y los que presentan FQ^{5,36}. Los MPP persisten a

lo largo del tiempo, incrementan su número durante las exacerbaciones y es difícil erradicarlos durante el tratamiento con antimicrobianos.

Existen trabajos en los que se demuestra la importancia de realizar estudios microbiológicos a partir de muestras de esputo, secreciones respiratorias o de lavado broncoalveolar con el objetivo de establecer los MPP, ya que estos son los que se correlacionan con el proceso de "colonización patogénica" y el deterioro de la función pulmonar. Los porcentajes y tipo de microorganismos pueden variar dependiendo de la edad del paciente y su situación clínica. En general, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* son los MPP más importantes²⁸. Con ellos se ha establecido una relación significativa entre la colonización y el deterioro de la función pulmonar y la obstrucción de la vía aérea, especialmente en el caso de *P. aeruginosa*¹⁷. En la población adulta, el MPP más frecuentemente encontrados es *H. influenzae*, generalmente no tipable, seguido de *P. aeruginosa* y de *M. catarrhalis* (Tabla 1)². También *H. influenzae* es el más frecuente en la población

Tabla 1- Microorganismos potencialmente patógenos más frecuentemente aislados en las muestras respiratorias de pacientes adultos con bronquiectasias

Microorganismo	% de aislamiento
<i>H. influenzae</i> no tipable	30-45
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10-30
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5-15
<i>Moraxella catarrhalis</i>	5-10
Enterobacterias	5-8
<i>Nocardia</i> spp.	<4%
<i>Staphylococcus aureus</i>	<2%
Otros bacilos gram-negativos no fermentadores	<2%
<i>Candida</i> spp.	4%
<i>Aspergillus</i> spp.	<2%

pediátrica seguido de *S. pneumoniae* (Tabla 2). *S. aureus* es relativamente infrecuente y su aislamiento repetido puede indicar un caso de FQ no diagnosticada. La co-colonización con diferentes microorganismos no es infrecuente tanto en los pacientes adultos como en los niños^{2,7,17}.

Con menor frecuencia que los anteriores se han encontrado microorganismos que también pueden clasificarse como MPP pero que no forman parte de la microbiota transitoria. Entre ellos destacan algunos del género *Nocardia* spp. (*Nocardia asteroides*), micobacterias no tuberculosas y hongos filamentosos (*Aspergillus fumigatus*)^{8,19,37}. En todos estos casos se necesitan requerimientos especiales de cultivo que han de tenerse en cuenta en el procesamiento de las muestras.

En los cultivos microbiológicos de las muestras respiratorias de los pacientes con BQ, al igual que en los pacientes con FQ, pueden aparecer variantes de colonias con diferentes morfotipos de un mismo microorganismo, sobre todo de *H. influenzae* no tipables y de *P. aeruginosa*. Estos pueden presentar igual o diferentes patrones de sensibilidad a los antimicrobianos. El hallazgo de *P. aeruginosa* con morfotipo mucoso suele asociarse con una colonización crónica. Suele producirse en los pacientes con peor función respiratoria y aunque su aislamiento se relaciona con un aumento de la expectoración y de mediadores de la inflamación en las secreciones respiratorias, existen datos discrepantes sobre su verdadero efecto patógeno^{10-12, 38}.

En los estudios de seguimiento a largo plazo en los pacientes con enfermedad pulmonar supurativa crónica, incluidos los que presentan BQ, se ha demostrado el aislamiento persistente de *H. influenzae* o de *P. aeruginosa* en más del 50% de ellos^{17,36}. El análisis por técnicas de microbiología molecular de estos aislados reveló que en el primer caso es frecuente el aislamiento de diferentes cepas e incluso la colonización simultánea por diferentes clones de *H. influenzae*^{17,39}. En el caso de *P. aeruginosa* y BQ no existen estudios longitudinales como en los pacientes con FQ o en

aquellos con EPOC en los que es habitual un patrón de colonización crónico por la misma cepa^{17,36}. Al igual que en la FQ, la erradicación de estos patógenos es prácticamente imposible aunque se ha demostrado que el tratamiento antimicrobiano reduce los recuentos bacterianos y mejora la función respiratoria⁴⁰.

Bronquiectasias y colonización-infección por *Pseudomonas aeruginosa*

La colonización de la mucosa respiratoria en los pacientes con BQ por *P. aeruginosa* se produce generalmente en los pacientes de mayor edad, peor función respiratoria, mayor número de ingresos hospitalarios y cursos de tratamiento antimicrobiano. En algunos de los estudios también se ha observado un mayor número de exacerbaciones^{9,10-12,38}. En este contexto, y similar a lo que sucede en otros pacientes con enfermedad supurativa crónica por este patógeno, se produce una adaptación de *P. aeruginosa* a las condiciones ambientales hostiles. Por una parte, el estado de alta densidad es comunicado entre las bacterias por moléculas específicas, denominadas "autoinductores", que se secretan y están controladas por un mecanismo de regulación conocido como *quorum-sensing*. Este mecanismo controla la formación de biopelículas y algunos de los factores de la virulencia⁴¹. Por otra parte, el que las bacterias se encuentren en un alto inóculo en un nicho concreto favorece la selección de mutantes resistentes, sobre todo en las cepas en las que se produzcan procesos de hipermutación, situación también descrita en los pacientes con BQ⁴².

Aunque menos estudiado, también se ha demostrado que otros patógenos que colonizan la vía aérea del paciente con BQ, como *H. influenzae* y *S. pneumoniae* son también capaces de desarrollarse en biopelículas y que también expresan mayor frecuencia de mutación y tasas de resistencias cuando se aíslan de pacientes con colonización crónica de la vía aérea que cuando se aíslan en infecciones agudas⁴³⁻⁴⁵.

Tabla 2- Microorganismos aislados en población pediátrica en asociación con el diagnóstico inicial de bronquiectasias
(adaptado de la referencia 7)

DIAGNÓSTICO INICIAL

Microorganismo	Inmunodeficiencia (%)	Idiopática (%)	Aspiración (%)	Discinesia ciliar (%)	Malformación congénitas (%)	Infección en la infancia (%)
<i>H. influenzae</i>	39	59	47	47	100	40
<i>S. pneumoniae</i>	15	19	20	32		40
<i>P. aeruginosa</i>	12	19	10	16		
<i>S. aureus</i>	9		5			20
MRSA1	3		10	5		
<i>M. catarrhalis</i>	9					
<i>C. albicans</i>	9					
<i>Aspergillus</i> spp	3					
<i>S. maltophilia</i>	3	3				
<i>Klebsiella</i> spp.						
<i>Proteus</i> spp.			5			
≥2 aislados	23,5	21,8	10,5	10,5		20

¹ *S. aureus* resistente a meticilina

Factores de virulencia en *P. aeruginosa*

Durante la infección crónica, la adaptación de la población bacteriana al ambiente de la vía aérea se correlaciona con una considerable variación genética y la acumulación de mutaciones con pérdida de función en genes específicos de *P. aeruginosa*. Una mutación muy frecuente se produce en el gen *muca*, que determina una transición de fenotipo no mucoso al fenotipo mucoso, con sobreproducción de alginato. Las variantes mucosas de *P. aeruginosa* tienen un interés especial como indicador de la infección crónica ya que también se asocian a un peor pronóstico, mayor deterioro de la función pulmonar y mayor daño tisular⁴⁶.

Otros cambios fenotípicos incluyen la pérdida de los flagelos y del pili efector de la motilidad, factores que son importantes durante la colonización superficial⁴⁷. Ade-

más se produce la pérdida de componentes del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y producción de piocianina; también hay aparición de variantes auxotróficas, cepas multirresistentes y crecimiento en biopelículas.

Entre los genes controlados por *quorum sensing* destacan aquellos que codifican factores de virulencia o productos para la interacción bacteria-huésped. En *P. aeruginosa*, la producción de varios factores de virulencia (exoproteasas, sideroforos, exotoxinas y metabolitos secundarios) dependen de los dos sistemas de *quorum sensing* que posee (LasR–LasI y RhlR–RhlI) y que involucran a moléculas señal N-acil-homoserin-lactona (AHL). Otros factores de virulencia descritos en la literatura incluyen algunos productos extracelulares como elastasa, hemolisina, piocianina y ramnolipidos (tabla 3)⁴⁸. Estos factores contribuyen al deterioro de la mucosa bronquial y de la función pulmonar.

Tabla 3- Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Factor de patogenicidad	Función
Flagelos	Motilidad, quimiotaxis
Alginato	Adherencia, formación de biopelículas Evasión del sistema inmunitario
Pili	Adherencia, reconocimiento de receptores específicos
Lipopolisacárido (LPS)	Adherencia, efecto endotóxico, formación de inmunocomplejos
Exotoxina-A	Inhibición de la síntesis de proteínas
Exotoxina-S	Adherencia, inhibición de la síntesis de proteínas
Elastasas, proteasa Alcalina	Interferencia con el sistema humoral y celular Formación de inmunocomplejos. Actividad antiestafilocócica Degradación de colágeno, elastina, laminina y fibronectina Destrucción de los cilios de las células epiteliales respiratorias
Leucocidina	Citotoxina, incremento de la permeabilidad de membrana
Fosfolipasa C	Degradación de lecitina
Lipasa	Inhibición de quimiotaxis de monocitos
Ramnolípido	Estímulo del metabolismo oxidativo de monocitos
Pigmentos fenacínicos	Inhibición de la proliferación de linfocitos Modificación de funciones en polimorfonucleares Alteración de la función mucociliar de las células epiteliales Quelación de hierro
Sistemas de secreción tipo III	Interacción con la célula eucariota (activación de citoquinas y liberación de neutrófilos)

Formación de biopelículas en *P. aeruginosa*

Las biopelículas bacterianas han sido ampliamente estudiadas durante la última década, y actualmente se reconocen como el crecimiento predominante de los microorganismos en superficie. *P. aeruginosa* tiene un interés especial como modelo del desarrollo del biopelículas debido a que, además de ser un patógeno habitual en humanos, también se caracteriza por ser un organismo con una capacidad muy versátil para persistir y proliferar en ambientes distintos, incluyendo el pulmón del paciente con BQ⁴⁹.

En la definición del crecimiento en biopelículas (o crecimiento sésil) debe tenerse en consideración no solamente las características fácilmente observables, por ejemplo, las células irreversiblemente unidas a una superficie y encajadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, sino también otras cualidades fisiológicas, como las tasas de crecimiento y de transcripción ralentizada con respecto a las bacterias en crecimiento exponencial (microorganismos planctónicos)⁵⁰.

En general, el componente mayoritario de las biopelículas es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y células bacterianas, la matriz de las biopelículas es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias⁵¹. Como por ejemplo, los ramnolipidos, moléculas surfactantes producidas por *P. aeruginosa* que desempeñan un papel en el mantenimiento de canales en la estructura de la biopelícula y que confieren una estructura con forma de seta⁵². También, la expulsión programada de DNA (que tiene una consistencia pegajosa) determina la formación una matriz para este tipo de crecimiento que agrava aún más su consistencia y dificulta la eliminación del pulmón de los pacientes⁵³.

Los estudios realizados con microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida y que presenta los canales señalados anteriormente que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas. Su existencia no evita sin embargo, que dentro de su estructura, se produzcan distintos ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente⁵⁴. Esta situación favorece la variación y estimula aún más la formación y estabilidad de las biopelículas.

La etapa inicial del proceso de formación de biopelículas es la adherencia sobre la superficie; en el caso de las BQ, la mucosa bronquiectática afectada. Una vez que las bacterias se han adherido, comienzan a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia. En una etapa posterior se secreta un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria, siendo el alginato en *P. aeruginosa*. Finalmente, algunas bacterias de la matriz de esta estructura se liberan para colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de formación y aumentando las dificultades para su eliminación⁵⁰. Como se indicó con anterioridad todo el proceso de formación y estabilidad de las biopelículas está regulado por un proceso de *quorum sensing* o autoinducción.

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con las biopelículas de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que estas últimas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, en las infecciones asociadas a biopelículas no se consiguen por completo y se producen episodios recurrentes. Esto se debe a que las bacterias en crecimiento sésil pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido⁵⁰. La naturaleza de la estructura de las biopelículas y las características fisiológicas de los or-

ganismos que lo forman confiere una resistencia inherente a los agentes antimicrobianos y defensas del organismo⁵⁵. Las bases de su resistencia podrían deberse a diferentes razones:

- La barrera de difusión física y química y resistencia a la penetración de los antimicrobianos a través de la matriz de exopolisacáridos de la biopelícula.
- El crecimiento ralentizado de las bacterias en las biopelículas debido a la limitación de nutrientes.
- La activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo específico que evita los efectos negativos de los antimicrobianos. Este hecho estaría en relación a la capacidad de variación e hipermutabilidad.

Entre todas estas posibles razones, la explicación más intuitiva es la incapacidad del antibiótico para penetrar en la biopelícula a través de la matriz exopolisacáridica y ejercer su efecto inhibitorio o letal sobre las bacterias que componen esta estructura. Las sustancias poliméricas extracelulares que constituyen esta matriz actúan como barrera para estas moléculas influenciando su transporte al interior de la biopelícula o la reacción del antimicrobiano con el material de la matriz. Asimismo, la capa de alginato de las cepas mucosas de *P. aeruginosa* parece prevenir contra los anticuerpos y bloquea los determinantes inmunológicos requeridos para la fagocitosis opsónica, por lo que se dificulta la acción de los antimicrobianos.

Respecto a la alteración de la tasa de crecimiento de los microorganismos en las biopelículas se ha observado que crecen considerablemente más lentos que en las células planctónicas, por lo que se dificulta la acción de los antimicrobianos.

Hipermutación e inóculo bacteriano

La hipermutación es un fenómeno que se ha demostrado en las poblaciones de *P. aeruginosa* procedentes

de pacientes con BQ y FQ y que facilita fenómenos de adaptación a nuevos ambientes o a condiciones adversas y también el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos⁵⁶. Un hipermutador o población bacteriana hipermutadora es aquella que tiene una tasa de mutación espontánea significativamente superior a la normal (de 100 a 1000 veces). Es debido a la alteración de genes que participan en los sistemas de edición durante la replicación del DNA (sistemas de reparación "mismatch" o MMR). En el laboratorio y en experimentos teóricos, las bacterias hipermutadoras tienen ventajas evolutivas cuando se enfrentan a ambientes nuevos, cambiantes o estresantes. El proceso de intensa adaptación genética dirigido por la acumulación de múltiples mutaciones favorece la persistencia a largo tiempo con alta resistencia a los antibióticos y al sistema inmune y con virulencia reducida. En los pacientes con FQ se ha descrito la acumulación de numerosas mutaciones en *P. aeruginosa* a lo largo del tiempo, situación que podría también producirse en los pacientes con BQ⁵⁷.

El tratamiento antibiótico puede ser considerado como un factor de estrés que favorecería la selección y el aumento de la resistencia a los antimicrobianos, que una vez presente aumentarían la posibilidad de una subsiguiente generación de mutantes resistentes a antibióticos adicionales⁵⁸. *P. aeruginosa* esta genéticamente preparada, a diferencia de otras bacterias, para generar mutantes que son resistentes a las concentraciones clínicas de todos los antimicrobianos⁵⁹. Este hecho se incrementa en cepas mutadoras o con tasas de mutación elevadas y se agrava en las infecciones crónicas con alto inóculo bacteriano, tal y como sucede en la colonización broncopulmonar en los pacientes con BQ. Con inóculos elevados el número absoluto de mutantes se incrementa y es más sencilla su selección bajo el tratamiento antimicrobiano.

Se ha descrito la elevada frecuencia (43%) de cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras en los pacientes con FQ, siendo incluso mayor (53%) en los pacientes con bronquiectasias crónicas^{42,60} (figura 1). Se ha estudiado en modelos animales (modelo murino) las conse-

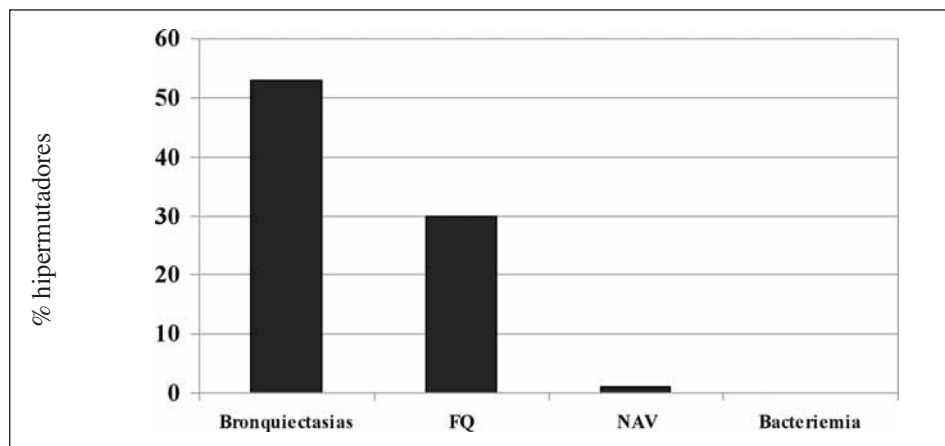


Figura 1. Frecuencia de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo hipermutador procedente de pacientes con bronquiectasias, fibrosis quística (FQ), neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV) y bacteriemia (datos tomados de las referencias 42 y 60).

cuencias de la hipermutación de *P. aeruginosa* en la resistencia a los antibióticos, demostrándose su desarrollo bajo tratamiento en monoterapia y su ausencia en tratamiento combinado⁶¹.

Asimismo, el proceso de intensa adaptación genética dirigido por la acumulación de múltiples mutaciones favorece la persistencia a largo tiempo. Sin embargo, como consecuencia, *P. aeruginosa* sufre un coste biológico disminuyendo su *fitness* y virulencia⁶².

Procesamiento microbiológico de las muestras respiratorias en los pacientes con bronquiectasias

El diagnóstico de la colonización bacteriana en los pacientes con BQ debe realizarse mediante cultivo microbiológico de las secreciones respiratorias. Recientemente, se han incorporado técnicas de microbiología molecular que podrían ser útiles en la detección de situaciones de colonizaciones primarias o microorganismos de crecimiento lento como es el caso de las micobacterias no tuberculosas.

La toma de muestras respiratorias para el estudio microbiológico en los pacientes con BQ se debe realizar

cuando es preciso documentar la presencia de MPP específicos bien por que no exista una respuesta al tratamiento antimicrobiano instaurado o exista sospecha de resistencias a los antimicrobianos o cambios en los patrones de colonización. Los cultivos se deben realizar preferentemente con esputos que presenten una valoración microscópica que excluya posibles contaminaciones con microbiota del tracto respiratorio superior durante su obtención (>25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales por campo microscópico con bajo aumento) o a partir de muestras obtenidas mediante fibrobroncoscopia^{17,40,63}. El esputo, aunque es la muestra para cultivo microbiológico más sencilla de obtener, no presenta una buena rentabilidad. Hasta el 40% de ellos pueden ser negativos para el cultivo de MPP, cifra que se reduce al 30% en el caso de procesarse muestras obtenidas por broncoscopia⁹. No obstante, el tipo de muestra que se obtiene puede influir en los microorganismos encontrados, siendo las muestras tomadas con broncoscopio y cepillado protegido las más rentables para el aislamiento de los MPP.

Los cultivos microbiológicos utilizados para el cultivo deben incluir medios generales y selectivos diferenciales. Con esta práctica se incrementa la rentabilidad del

cultivo y se favorece la diferenciación de los distintos MPP. En la tabla 4 se indican los medios de cultivo recomendables y las condiciones óptimas de incubación. Debe prestarse especial atención al posible crecimiento de colonias pequeñas (*small colony variants*) y de diferentes morfotipos de una misma especie, por ejemplo *P. aeruginosa*, ya que pueden presentar diferentes perfiles de sensibilidad a los antimicrobianos.

La realización de recuentos bacterianos en los cultivos microbiológicos de rutina es un aspecto controvertido⁶⁴. No parece ser recomendable por el tiempo empleado

en su realización y la utilidad de los datos obtenidos pero debería ser utilizado en la evaluación de nuevos tratamientos, incluyendo las asociaciones de antimicrobianos⁴⁰.

Recientemente se ha enfatizado la importancia del aislamiento en las BQ de las micobacterias no tuberculosas^{65,66}. Se aíslan en aproximadamente un 2% de los pacientes. El cultivo de estos microorganismos requiere una comunicación expresa al laboratorio de microbiología de esta solicitud para establecer los cultivos y condiciones que aseguren su aislamiento (Tabla 4). El

Tabla 4.- Medios de cultivo recomendables, condiciones óptimas de incubación y objetivo de los mismos

Medio decultivo	Condiciones de incubación	Comentario
Agar sangre	35°C, 48 horas	Puede prolongarse su incubación en condiciones adecuadas de humedad hasta 5-7 días para el aislamiento de <i>Nocardia</i> spp.
Agar chocolate	35°C, 48 horas, CO2	Tiene como objetivo el aislamiento de <i>H. influenzae</i> . Si existe cocolonización por <i>P. aeruginosa</i> se recomienda incubar en anaerobiosis o sustituir este medio por agar chocolate con bacitracina
Agar de MacConkey	35°C, 48 horas	Medio selectivo diferencial para bacilos gram-negativos, incluyendo <i>P. aeruginosa</i>
Saboraud ± cloranfenicol y actidiona	35°C y 30°C, hasta 4 semanas	Medios selectivos para el crecimiento de hongos
Löwestein Jensen o <i>Coletsos</i> y medios líquidos selectivos de enriquecimiento	35°C, hasta 4 semanas	Tienen como objetivo el aislamiento de micobacterias. Debe realizarse una decontaminación previa de la muestra

estudio de micobacterias no tuberculosas debe realizarse en pacientes con lesiones fibronodulares en los controles radiológicos que no respondan al tratamiento habitual y conlleve un deterioro clínico del paciente. Para un aislamiento eficiente de estas micobacterias se deben utilizar medios específicos y someter a las muestras a un proceso de decontaminación que elimine otras bacterias y posibles hongos contaminantes (Tabla 4). La realización de una tinción específica para bacterias ácido-alcohol resistentes (Tinción de Ziehl-Nielsen o preferentemente fluorescente con auramina) pueden ser útiles para alertar de la posibilidad de una colonización por estos microorganismos. No obstante en los casos en los que se obtenga una tinción positiva debe realizarse una amplificación genómica que excluya la presencia de *M. tuberculosis* y la instauración de las medidas epidemiológicas que conlleva una baciloscopia positiva.

Nocardia spp., en su mayoría *Nocardia asteroides*, también puede aislarse en las muestras respiratorias del paciente con BQ y puede producir colonización crónica en estos pacientes^{8,37}. En trabajos en los que se han utilizado medios selectivos se produce un aumento en la frecuencia de su aislamiento. Asimismo, una tinción de Gram previa al cultivo puede ser útil para orientar el estudio microbiológico, disponer de medios selectivos y condiciones de incubación que aseguren su aislamiento.

La presencia de hongos levaduriformes no es un hecho infrecuente en las muestras respiratorias del paciente con BQ (aproximadamente en un 2% de los pacientes), aunque en la mayoría de las ocasiones no presentan un efecto patogénico⁷⁹. Una situación diferente se produce con el aislamiento de hongos filamentosos, en general *A. fumigatus*, en la que el riesgo de una implicación patogénica (aspergilosis broncopulmonar alérgica) es mayor. Este riesgo se incrementa en los pacientes con peor función respiratoria⁶⁷. Asimismo, su aislamiento es más probable en pacientes con BQ colonizados por micobacterias no tuberculosas⁶⁸. El aislamiento de estos microorganismos se facilita con la utilización de medios selectivos (Tabla 4).

Estudio de sensibilidad y valoración de las resistencias

Como se indicó con anterioridad los MPP que colonizan en el pulmón del paciente con BQ, incluyendo *P. aeruginosa*, desarrollan con facilidad resistencia a los antimicrobianos durante el tratamiento, en la mayoría de los casos por mecanismos mutacionales. Por este motivo es necesario el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos, sobre todo en los casos en los que no se obtengan beneficios terapéuticos y sea preciso modificar y ajustar la pauta de tratamiento.

El seguimiento a largo plazo de los pacientes con BQ ha demostrado el aumento de la resistencia a los antimicrobianos en los patógenos aislados en las secreciones respiratorias, esencialmente *H. influenzae* y *P. aeruginosa*. Este aumento se asocia con una mayor frecuencia de exacerbaciones y necesidad de hospitalización¹⁷. En los casos en los que se realice un estudio microbiológico y se aislen MPP debe realizarse un antibiograma, incluyendo en el estudio los antimicrobianos que permitan definir perfiles que guíen el tratamiento. Asimismo, dada la variabilidad de morfotipos en los patógenos encontrados en las secreciones respiratorias de los pacientes con BQ, se recomienda la realización de antibiogramas de cada uno de ellos.

En los pacientes con BQ, la administración de antimicrobianos se asocia con el desarrollo de resistencias^{9,17,69,70}. La colonización crónica, los recuentos elevados, la presión selectiva con antimicrobianos y la farmacocinética poco favorable de algunos antibióticos en la mucosa respiratoria o líquido de revestimiento epitelial favorecen el desarrollo de resistencias. Este hecho queda magnificado por el elevado inóculo y elevada frecuencia de mutadores que incrementa el riesgo de desarrollo de resistencias⁷¹.

Asimismo el crecimiento de las bacterias que colonizan el tracto respiratorio en los pacientes con BQ al igual que en la FQ o con EPOC suele producirse formado biopelículas⁷². Bajo estas características, se reduce la actividad de muchos antimicrobianos lo que

explicaría en parte la dificultad de erradicación de los microorganismos y la escasa correlación entre la sensibilidad "in vitro" convencional y la respuesta al tratamiento antimicrobiano^{73,74}.

Estudio rutinario de sensibilidad en crecimiento planctónico

El estudio de sensibilidad a los antimicrobianos en el laboratorio suele realizarse a partir de colonias aisladas y con cultivos en crecimiento exponencial (crecimiento planctónico). Las técnicas que se utilizan suelen ser de difusión (antibiogramas con discos de papel impregnados con antibióticos) o por dilución. Estas últimas permiten el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y suelen emplear paneles comerciales asociados a equipos automáticos que per-

miten un mayor volumen de trabajo que las técnicas manuales. Los valores de CMI obtenidos se interpretan siguiendo criterios internacionales y los resultados se ofrecen en los informes del laboratorio como categorías clínicas: sensible (alta probabilidad de éxito terapéutico), intermedio (posibilidad de éxito terapéutico si se modifica el esquema de tratamiento con aumento de dosis o disminución del intervalo entre dosis) o resistente (baja probabilidad de éxito terapéutico). Actualmente existen sistemas de difusión que permiten también determinar el valor de la CMI, como el método por Etest. Emplea tiras de plástico que llevan adheridas antimicrobiano en un gradiente de concentración que al contacto con el agar difunde y producen una elipse de inhibición. La intersección de la elipse de inhibición con la tira coincide con el valor de la CMI (figura 2). Tiene como ventaja una observación visual del crecimiento y la posibilidad de monitorizar la presencia

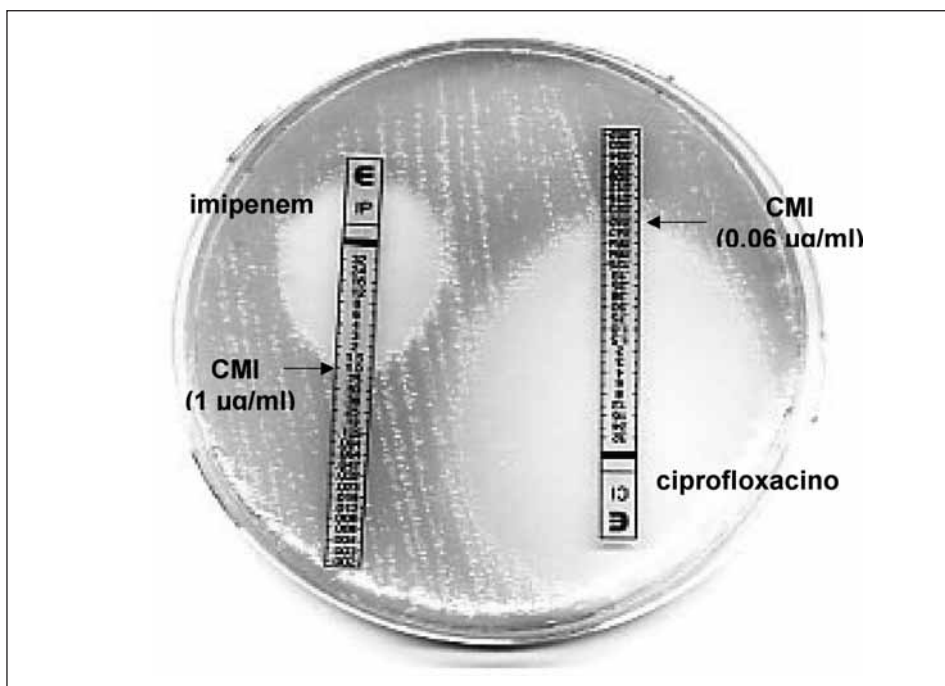


Figura 2. Determinación de la sensibilidad de *P. aeruginosa* por el método de Etest. Los valores de CMI de imipenem y ciprofloxacino coinciden con la intersección del halo de la elipse con la tira.

de mutantes resistentes dentro de las elipses de inhibición, pudiendo ayudar al reconocimiento fenotípico de las poblaciones mutadoras y por tanto con mayor riesgo de seleccionar resistencias durante el tratamiento.

Estudio de la sensibilidad en biopelículas

En los aislados de *P. aeruginosa* de los pacientes con FQ se ha comprobado que el estudio de sensibilidad con los sistemas convencionales de microdilución, incluyendo los sistemas automáticos podría no reflejar la realidad de lo que acontece en el pulmón crónicamente colonizado⁷⁵. Esta diferencia también ocurriría en los aislados de pacientes con BQ y podría ser debido a una mayor lentitud de crecimiento de los aislados y a su estado natural de crecimiento en biopelículas. Por este motivo, se han desarrollado sistemas de estudio de sensibilidad de bacterias en crecimiento en biopelículas.

Para determinar la sensibilidad de los microorganismos en crecimiento sésil se emplean técnicas que utilizan como inóculo la propia biopelícula previamente formada. Estas técnicas tienen el inconveniente de no estar automatizadas como las que utilizan inóculos con crecimientos exponenciales. Se han realizado intentos por adaptar métodos desarrollados en laboratorios de investigación, pero todavía no se ha adoptado ningún protocolo estándar para este fin. Entre estos métodos destacan por su facilidad para adaptarse al diagnóstico clínico el método denominado *Calgary Biofilm Device*⁷⁶. Utiliza una placa de microtitulación de 96 pocillos con una tapa especial con 96 púas o pinchos que se introducen y ajustan perfectamente en cada uno de los pocillos de las placas de microtitulación. Los biofilms formados sobre las púas de la tapa se pueden llevar a otra placa para su exposición a distintas concentraciones de antibiótico. Finalmente, el número de bacterias supervivientes se cuantifican realizando recuentos en medios de cultivo. Otros métodos utilizan una cuantificación final del número de bacterias viables que han

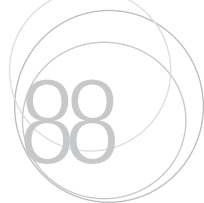
resistido el tratamiento antimicrobiano midiendo la cantidad de ATP por bioluminiscencia.

Un método con bastante utilización es el descrito por Moskowitz et al.⁷⁴. Fue desarrollado para determinar la sensibilidad antimicrobiana de las cepas de *P. aeruginosa* formadoras de biopelículas que se expresa como concentración mínima inhibitoria de la biopelícula (CMIB). Este método consiste en estudiar la formación del biofilm que tiene lugar en la correspondiente tapa de 96 pinchos o púas de poliestireno. Una vez formadas las biopelículas se utilizan como inóculo y se transfieren a otras placas de microtitulación con antimicrobianos. El efecto del antimicrobiano sobre las biopelículas se mide por espectrofotometría. También se han desarrollado sistemas de crecimiento de las biopelículas en "cámara de flujo" mediante microscopía confocal. Por sus características está reservada para el campo de la investigación.

Actividad de los antimicrobianos frente a biofilm

Los antibióticos beta-lactámicos (ceftazidima e imipenem) presentan actividad bactericida frente a microorganismos en fase de crecimiento rápido. Sin embargo reducen drásticamente su actividad sobre bacterias asociadas a biopelículas ya que crecen considerablemente más lentamente que las células planctónicas debido a la limitación de nutrientes. A diferencia de estos antimicrobianos, las fluoroquinolonas (levofloxacino y ciprofloxacino), son también antibióticos bactericidas sobre células en ausencia de crecimiento y por tanto capaces de actuar frente a las biopelículas. Este efecto se ha comprobado en *P. aeruginosa* en crecimiento sésil.

La tobramicina es otro antimicrobiano bactericida que puede actuar sobre bacterias que no se encuentran en fase de división. Sin embargo, a diferencia de las fluoroquinolonas, pueden unirse al exopolisacárido de las biopelículas y su actuación es algo más lenta⁵⁴. Se ha demostrado que la adsorción de los antimicrobianos



cargados positivamente, como los aminoglucósidos, al alginato, cargado negativamente, retarda la penetración a través del biofilm.

Por otra parte, existen evidencias que sugieren que la aparente actividad de los macrólidos frente a *P. aeruginosa in vivo* pueden provenir de su actividad antiinflamatoria y/o modulación de la producción de alginato u otros factores como la interferencia con los sistemas de *quorum-sensing*. Estos sistemas se activarían en condiciones de fase estacionaria y anaerobiosis⁷⁵. En la tabla 5 se indican los valores de CMI y BIC obtenidos respectivamente cuando *P. aeruginosa* presenta un crecimiento exponencial y cuando está formando biopelículas.

Conclusiones

Las alteraciones producidas en la mucosa respiratoria en el paciente con BQ, consecuencia de una dilatación irreversible de la vía aérea, facilitan su colonización por los denominados MPP. Su persistencia en la mucosa

respiratoria determina un estado inflamatorio crónico con destrucción de la pared bronquial y deterioro progresivo de la función pulmonar. En algunos pacientes existe un claro origen infeccioso, relacionado con infecciones respiratorias durante la infancia mientras que en otros presenta causas idiopáticas. El estudio microbiológico de la colonización broncopulmonar en el paciente con BQ es muy similar al que se realiza en los pacientes con EPOC o con FQ. *H. influenzae* y *S. pneumoniae* son los MPP más prevalentes tanto en niños como en paciente adultos. En estos últimos también se aísla con elevada frecuencia *P. aeruginosa*, particularmente en los pacientes de mayor edad y peor función pulmonar. El alto inóculo bacteriano y el crecimiento en biopelículas dificultan la erradicación de los MPP. Asimismo, la presencia de fenómenos de hipermutación, claramente demostrados con *P. aeruginosa* en estos pacientes, incrementa el riesgo de desarrollo de resistencias e impide la eficacia de los tratamientos antimicrobianos.

Tabla 5.- Valores de CMI y BIC obtenidos respectivamente cuando *P. aeruginosa* presenta un crecimiento exponencial (crecimiento planctónico) y cuando está formando biopelículas (crecimiento sésil) (tomado de la referencia 74).

Antibiótico	CMI		CMIB	
	rango	MIC ₅₀	Rango	CMIB ₅₀
Piperacilina	≤1-1,024	4	≤16->512	256
Tazobactam	≤2-512	2	≤2->128	128
Ceftazidima	≤1-16	≤1	≤1->64	64
Meropenem	≤0.25-16	1	≤0.25->16	4
Ciprofloxacina	≤0.25->512	2	≤1->64	4
Tobramicina	≤0.5-8	≤0.5	8->128	128
Azitromicina	NA	NA	≤0.5->32	2

Bibliografía

1. Cole PJ. Inflammation: a two-edged sword—the model of bronchiectasis. *Eur J Respir Dis.* 1986 (Suppl); 147:6-15.
2. Barker AF. Bronchiectasis. *N Engl J Med.* 2002; 346:1383-93.
3. Martínez García MA. Bronquiectasias: ¿todavía una enfermedad huérfana? *Arch Bronconeumol.* 2005; 41:407-9.
4. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 336-63.
5. Cantón R, Cobos N, de Gracia J, et al; on behalf of the Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 690-703.
6. Donnelly D, Critchlow A, Everard ML. Outcomes in children treated for persistent bacterial bronchitis. *Thorax.* 2007; 62:80-4.
7. Hill D, Rose B, Pajkos A, et al. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5085-90.
8. Angrill J, Agusti C, De Celis R, et al. Bronchial inflammation and colonization in patients with clinically stable bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164:1628-32.
9. Angrill J, Agusti C, de Celis R, et al. Bacterial colonisation in patients with bronchiectasis: microbiological pattern and risk factors. *Thorax.* 2002; 57:15-9.
10. Evans SA, Turner SM, Bosch BJ, et al. Lung function in bronchiectasis: the influence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J.* 1996; 9:1601-4.
11. Miskiel KA, Wells AU, Rubens MB, et al. Effects of airway infection by *Pseudomonas aeruginosa*: a computed tomographic study. *Thorax* 1997; 52:260-4.
12. Ho PL, Chan KN, Ip MS, et al. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* infection on clinical parameters in steady-state bronchiectasis. *Chest.* 1998; 114:1594-8.
13. Pang G, Clancy R, Cong M, et al. Influenza virus inhibits lysozyme secretion by sputum neutrophils in subjects with chronic bronchial sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:718-22.
14. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164:1618-23.

15. Edwards EA, Asher MI, Byrnes CA. Paediatric bronchiectasis in the twenty-first century: experience of a tertiary children's hospital in New Zealand. *J Paediatr Child Health*. 2003; 39:111-7.
16. Shoemark A, Ozerovitch L, Wilson R. Aetiology in adult patients with bronchiectasis. *Respir Med*. 2007; 101: 1163-70.
17. King PT, Holdsworth SR, Freezer NJ, et al. Microbiologic follow-up study in adult bronchiectasis. *Respir Med*. 2007; 101:1633-8.
18. Watt AP, Brown V, Courtney J, et al. Neutrophil apoptosis, proinflammatory mediators and cell counts in bronchiectasis. *Thorax*. 2004; 59:231-6.
19. King P, Holdsworth S, Freezer N, et al. Bronchiectasis. *Intern Med J*. 2006; 36:729-37.
20. Morrissey BM. Pathogenesis of bronchiectasis. *Clin Chest Med*. 2007; 28:289-96.
21. Sietta M, Di Stefano A, Maestrelli P, et al. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150:1646-52
22. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, et al. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2002; 57: 847-52.
23. Patel IS, Vlahos I, Wilkinson TM, et al. Bronchiectasis, exacerbation indices, and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170:400-7.
24. Guran T, Ersu R, Karadag B, et al. Association between inflammatory markers in induced sputum and clinical characteristics in children with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Pediatr Pulmonol*. 2007; 42:362-9.
25. Chan SC, Shum DK, Tipoe GL, et al. Upregulation of ICAM-1 expression in bronchial epithelial cells by airway secretions in bronchiectasis. *Respir Med*. 2008; 102:287-98.
26. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, et al. Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis: a new marker of oxidative stress. *Thorax*. 1998; 53: 867-70.
27. Loukides S, Horvath I, Wodehouse T, et al. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158:991-4.
28. Foley SC, Hopkins NO, Fitzgerald MX, et al. Airway nitric oxide output is reduced in bronchiectasis. *Respir Med*. 2007; 101: 1549-55.
29. Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TMA, et al. Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173: 71-8.
30. Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TMA, et al. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J*. 2007; 29: 527-34.
31. Martínez-García MA, Soler-Cataluña JJ, Perpiñá-Tordera M, et al. Factors associated with lung function decline in adult patients with stable non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Chest*. 2007; 132:1565-72.
32. Rosen MJ. Chronic cough due to bronchiectasis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2006; 129(1 Suppl):122S-31S.

33. De Gracia J, Rodrigo MJ, Morell F, et al. IgG subclasses deficiencies associated with bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153:650-5.
34. Hill SL, Mitchell JL, Burnett D, et al. IgG subclasses in the serum and sputum from patients with bronchiectasis. *Thorax.* 1998 53: 463-8.
35. Martínez-García MA, Román-Sánchez P, Perpiñá-Tordera M, et al. Bronquiectasias en pacientes mayores de 65 años. Estudio de los valores séricos de las subclases de inmunoglobulina G. *Med Clin. (Barc)* 2007; 129:525-9.
36. Sethi S, Evans N, Grant BJ, et al. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2002; 347:465-71.
37. Cremades MJ, Menendez R, Santos M, et al. Repeated pulmonary infection by *Nocardia asteroides* complex in a patient with bronchiectasis. *Respiration.* 1998; 65:211-3.
38. Davies G, Wells AU, Doffman S, et al. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* on pulmonary function in patients with bronchiectasis. *Eur Respir J.* 2006; 28:974-9.
39. Murphy TF, Sethi S, Klingman KL, et al. Simultaneous respiratory tract colonization by multiple strains of nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease: implications for antibiotic therapy. *J Infect Dis.* 1999; 180: 404-9.
40. Bilton D, Henig N, Morrissey B, et al. Addition of inhaled tobramycin to ciprofloxacin for acute exacerbations of *Pseudomonas aeruginosa* infection in adult bronchiectasis. *Chest.* 2006; 130: 1503-10.
41. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Bacterial communications in implant infections: a target for an intelligence war. *Int J Artif Organs.* 2007; 30: 757-63.
42. Maciá MD, Blanquer D, Togores B, et al. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 3382-6.
43. García-Castillo M, Morosini MI, Valverde A, et al. Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis samples and blood cultures. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59:301-4.
44. Starner TD, Zhang N, Kim G, et al. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174: 213-20.
45. Román F, Cantón R, Pérez-Vázquez M, et al. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:1450-9.
46. Speert DP, Farmer SW, Campbell ME, et al. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to the phenotype characteristic of strains from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:188-94.
47. Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S, et al. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol.* 2003; 50:61-8.

48. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 2003; 22:3803-15.
49. Lee B, Haagensen JA, Ciofu O, et al. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5247-55.
50. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:167-93.
51. Branda SS, Vik S, Friedman L, et al. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 20-26.
52. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 2003; 185: 1027-36.
53. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* 2006; 59: 1114-28.
54. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56: 187-209.
55. Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L, et al. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2003;1: 667-83.
56. Blázquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:1201-9.
57. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 30; 103:8487-92.
58. Tanaka MM, Bergstrom CT, Levin BR. The evolution of mutator genes in bacterial populations: the roles of environmental change and timing. *Genetics.* 2003; 164: 843-54.
59. Hocquet D, Bertrand X, Köhler T, et al. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 1887-94.
60. Oliver A, Cantón R, Campo P, et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* 2000; 288: 1251-4.
61. Maciá MD, Borrell N, Segura M, et al. Efficacy and potential for resistance selection of antipseudomonal treatments in a mouse model of lung infection by hypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:975-83.
62. Hogardt M, Hoboth C, Schmoldt S, et al. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 2007; 195:70-80.
63. Cacho Calvo JB, Meseguer Peinado MA et al. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Procedimientos en Microbiología Clínica* nº 25. 2ª edición. Cercenado E, Cantón R (eds). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). (<http://www.seimc.org>)
64. Sethi S, Sethi R, Eschberger K, et al. Airway Bacterial Concentrations and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 15;176:356-61

65. Wickremasinghe M, Ozerovitch LJ, Davies G, et al. Non-tuberculous mycobacteria in patients with bronchiectasis. *Thorax*. 2005; 60: 1045-51
66. Fowler SJ, French J, Screamon NJ, et al. Nontuberculous mycobacteria in bronchiectasis: Prevalence and patient characteristics. *Eur Respir J*. 2006; 28:1204-10.
67. Gibson PG. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006; 27:185-91.
68. Kunst H, Wickremasinghe M, Wells A, et al. Nontuberculous mycobacterial disease and *Aspergillus*-related lung disease in bronchiectasis. *Eur Respir J*. 2006; 28:352-7.
69. Miravittles M. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: when are bacteria important? *Eur Respir J Suppl*. 2002; 36:9s-19s.
70. de la Campa AG, Ferrandiz MJ, Tubau F, et al. Genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated during ciprofloxacin therapy from a patient with bronchiectasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:1419-22.
71. Macia MD, Blanquer D, Togores B, et al. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:3382-6.
72. Starner TD, Zhang N, Kim G, et al. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174:213-20.
73. VanDevanter DR, Van Daltsen JM. How much do *Pseudomonas* biofilms contribute to symptoms of pulmonary exacerbation in cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol*. 2005; 39:504-6.
74. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, et al. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:1915-22.
75. Smith AL, Fiel SB, Mayer-Hamblett N, et al. Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis. *Chest*. 2003; 123:1495-502.
76. Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1771-6.