

SEPSIS BRONQUIAL CRÓNICA: Patrones de colonización patogénica

RAFAEL CANTÓN MORENO, MARÍA GARCÍA DEL CASTILLO Y ROSA DEL CAMPO MORENO.

Introducción

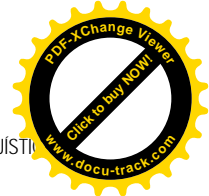
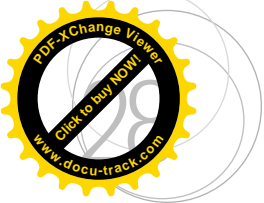
La mutación en el gen CFTR es responsable de las alteraciones que se producen en el paciente con fibrosis quística (FQ) y de las consecuencias finales derivadas de la colonización por microorganismos específicos que se desarrollan en árbol bronquial. Durante años se ha constatado que los pacientes con FQ presentan un sobrecrecimiento por determinadas bacterias que son capaces de acceder al tracto respiratorio inferior, esencialmente *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y sobre todo *Pseudomonas aeruginosa*. Estas bacterias desencadenan un proceso local inflamatorio que termina por lesionar la mucosa y el epitelio respiratorio^{1,2}.

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de la dinámica de colonización de los microorganismos implicados en la FQ y su variación a lo largo del tiempo. Este hecho ha sido posible gracias al seguimiento exhaustivo de los pacientes, al cultivo de los microorganismos a partir de sus secreciones respiratorias y a la aplicación de los métodos de micro-

biología molecular sobre los patógenos aislados. Gracias a ello se conocen los diferentes patrones de colonización que presentan estos pacientes y es posible adaptar las terapias antimicrobianas a cada una de las etapas en la que se encuentran los microorganismos aislados³. Frente a este avance se han abierto y respondido numerosas incógnitas de cómo se produce el efecto inflamatorio local, cuáles son los mediadores que participan en este proceso y las consecuencias a nivel local para el paciente con FQ². En el presente capítulo revisaremos los conocimientos actuales en este terreno, sobre todo los que implican a la colonización por *P. aeruginosa*.

Progresión temporal de la colonización e infección en el paciente con fibrosis quística

Los microorganismos que colonizan la vía aérea de los pacientes con FQ presentan una secuencia temporal relativamente establecida y asociada a la edad del pa-



ciente. Durante las primeras etapas de la vida, las infecciones víricas propias de la infancia (también en el individuo no fibrótico) pueden provocar la denudación del epitelio pulmonar, favoreciendo la colonización bacteriana recurrente y un estado local de inflamación crónica⁴. Se ha demostrado que diferentes agentes víricos entre los que se encuentran los *Adenovirus* y *Coronavirus* y también determinadas bacterias (*Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*) estimulan el sistema fagocítico, favoreciendo la descamación del epitelio y la atracción de los neutrófilos. Como consecuencia se produce una respuesta inflamatoria en el tracto respiratorio que puede evidenciarse incluso antes de que se aislen los patógenos clásicos y característicos de esta enfermedad.

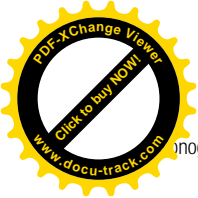
Tras este periodo inicial, la colonización más frecuente es la causada por *S. aureus* y *H. influenzae*. El primero es a menudo el patógeno que inicia el proceso de colonización crónica que caracteriza a los pacientes con FQ. Con posterioridad decrece su colonización, aumentando el aislamiento de *P. aeruginosa*, que se incrementa de forma gradual hasta convertirse en el patógeno más frecuente en la edad adulta. *H. influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* aparecen con menor frecuencia junto con otras especies como *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxydans* o *Stenotrophomonas maltophilia*⁵⁻⁷. Estas últimas tienen un interés creciente. En el caso de *B. cepacia* puede desarrollarse el denominado "síndrome cepacia" que conlleva un importante, rápido y fatal deterioro de la función pulmonar mientras que el resto de los microorganismos pueden marcar un peor pronóstico de la enfermedad ya que afecta a pacientes de mayor edad y dificultades la respuesta al tratamiento antimicrobiano por la multirresistencia que acompaña a estos microorganismos. Junto a estos se han aislado también otros considerados como patógenos emergentes por algunos autores entre los que se incluyen *Pandoraea spp.*, *Inquilinus limosus*, *Rhastonia spp.*, *Dolosigranulum pigrum* y *Dialister pneumosintes*⁸. Su adscripción patogénica es incierta y son necesarios aún más estudios que definan su relevancia y participación en el deterioro pulmonar.

Además, en los pacientes adultos o multitratados con antimicrobianos no es raro encontrar en el tracto respiratorio *Aspergillus spp.*, generalmente *Aspergillus fumigatus* y diversas especies de *Candida*. Mientras que estas últimas suelen considerarse microorganismos saprofitos sin interés clínico, *A. fumigatus* se asocia con la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). Otros hongos con importancia epidemiológica reciente en estos pacientes son *Scedosporium apiospermum* que podría favorecer un síndrome similar al ABPA. También *Pneumocystis jiroveci* que podría comportarse exclusivamente como colonizador del tracto respiratorio, aunque no se descarta un papel secundario relevante en la respuesta inflamatoria local⁹. Por último no es infrecuente en los pacientes también multitratados el aislamiento de micobacterias atípicas sobre todo *Mycobacterium avium* siendo excepcional el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

Debe resaltarse que en la mayoría de los pacientes, hasta el 70%, el patrón de colonización bronquial no siempre es monomicrobiano y pueden coexistir diferentes patógenos. En más del 50% de ellos aparecen simultáneamente *S. aureus* y *P. aeruginosa*, solos o en asociación con *H. influenzae* o *S. pneumoniae* y pueden existir sobrecolonizaciones con bacilos Gram negativos multirresistentes o patógenos emergentes, siendo difícil establecer los tratamientos antimicrobianos.

El por qué de la colonización en la FQ

La llegada inicial de los microorganismos patógenos al tracto respiratorio inferior del paciente con FQ y la consecuente primocolonización suele pasar desapercibida en la mayoría de las ocasiones, a no ser que se realicen tomas de muestras y cultivos microbiológicos consecutivos. Esta práctica ha aumentado en los últimos años gracias a los programas de cribado y diagnóstico neonatal de las mutaciones más frecuentes que se asocian con esta enfermedad. En el caso de *P.*



aeruginosa y *S. aureus*, ha demostrado claros beneficios ya que permite instaurar tratamientos erradicadores aunque no ha influido en la edad de adquisición de estos patógenos¹⁰.

Existen diversas teorías que tratan de explicar el por qué de la colonización bacteriana en el tracto respiratorio del paciente con FQ, la mayoría adaptadas al modelo de colonización-infección por *P. aeruginosa*. Ninguna de ellas responde individualmente de manera convincente a esta cuestión y probablemente unas sean complementarias de las otras. La primera hipótesis sugiere una posible respuesta inmunitaria innata defectuosa que determina una inflamación en la vía aérea del paciente con FQ que estaría presente desde los primeros meses de vida, incluso antes de la aparición de la infección. Existen pocos datos que la apoyen entre ellos la disminución de la concentración de una proteína sérica ("*mannose-binding lectin*") necesaria para el reconocimiento de la manosa y N-acetil-glucosamina de la superficie de los microorganismos que reduciría la activación del complemento y por tanto la fagocitosis. Este déficit podría contribuir al deterioro más rápido de la función pulmonar y una menor supervivencia de los pacientes colonizados. También se ha demostrado una menor concentración de IL10 cuyo déficit podría dar lugar a inflamación pulmonar severa. No obstante, parece clara una inflamación local exacerbada posterior a la colonización bacteriana en la que participan mediadores de la inflamación y neutrófilos, creándose un círculo vicioso que impide la eliminación de los microorganismos¹¹.

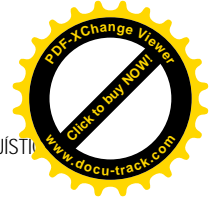
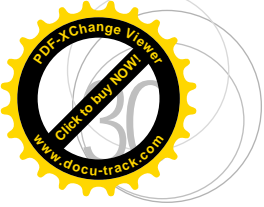
Una segunda hipótesis, actualmente desacreditada, sería la formación de receptores celulares específicos situados en la superficie apical de las células epiteliales. Estos receptores reconocerían epítopos de los diferentes microorganismos que afectan al paciente con FQ y facilitarían su persistencia en la mucosa. Esta teoría defiende que las organelas de las células epiteliales del tracto respiratorio en la FQ tienen modificado su pH, lo que reduciría la sialización

de glucoconjugados y conduciría al incremento en el número de moléculas de asialo-GM1 (asialogangliósido-1) que actuarían como receptores para muchas bacterias, incluyendo *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Sin embargo, se ha demostrado que los asialogangliósidos no son receptores para formas mucoides sin pili o flagelos, variantes habituales en la FQ. Por tanto, esta teoría solo tendría importancia durante la primocolonización.

También se ha sugerido que el gen CFTR no alterado sirve como receptor para *P. aeruginosa* en el proceso de internalización, fagocitosis y eliminación por descamación en el epitelio de la vía aérea. En la FQ estaría disminuida la unión de los patógenos al CFTR mutado, lo que permitiría la libre multiplicación de los microorganismos sobre la superficie mucosa. Esta ausencia de internalización también explicaría la observación de los microorganismos en moco endobronquial no adheridos al epitelio y con una ausencia de invasión de los tejidos adyacentes.

Por último, un efecto derivado de la afectación del gen CFTR en la FQ sería la deshidratación del moco y el aumento de la concentración de sal en las secreciones respiratorias con alteración de las defensas, péptidos naturales presentes en la mucosa y con actividad antimicrobiana^{12,13}. La deshidratación no solo afecta al movimiento de los cilios presentes en el epitelio sino que también disminuyen el desplazamiento de la capa de moco sobre el epitelio, favoreciéndose el atrapamiento de los microorganismos. Esta persistencia en condiciones de crecimiento microaerófilo o anaeróbico atribuible al consumo anormal de oxígeno de las células en la FQ favorecería la formación de biopelículas y el crecimiento de *P. aeruginosa* mucoides, principal fenotipo en la FQ, que resistiría la acción de los neutrófilos y facilitaría la cronicidad¹⁴. También la continua presencia de bacterias y neutrófilos que liberan DNA bacteriano de consistencia mucosa incrementa la viscosidad de las secreciones y dificulta su erradicación.





Origen de los microorganismos que colonizan el árbol bronquial y genotipos hipertransmisibles

Con independencia del conocimiento anteriormente expresado una de las preguntas más reiteradas y que carece de una respuesta clara es el origen de los microorganismos que colonizan el tracto respiratorio de los pacientes con FQ y si estos presentan características diferentes a los que infectan a pacientes con otras patologías. En el caso de *P. aeruginosa* se han realizado diferentes estudios que muestran un origen ambiental de los mismos, siendo escasos los casos en los que se producen transmisiones cruzadas entre pacientes. Asimismo, la aplicación de técnicas moleculares sobre los aislados estudiados ha demostrado una gran variabilidad de genotipos, aunque también se ha observado la persistencia de los mismos genotipos en el ambiente familiar, muchos de ellos en zonas húmedas (baños, sumideros, etc)¹⁵. También se han realizado estudios que alertan del posible contagio a partir de cepas hospitalarias, estimándose que el riesgo de adquisición es de 5,4 por cada mil contactos cuando los pacientes acuden a las consultas externas, aunque podría aumentar en pacientes hospitalizados¹⁶.

Por otra parte, a pesar de la gran variabilidad de genotipos entre los aislados de *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ, también se ha observado la existencia de determinadas cepas que se caracterizan por su carácter hipertransmisible y por asociarse a un mayor deterioro de la función pulmonar. Se han localizado en diferentes unidades y países, como Alemania, Gran Bretaña, Canadá o Australia¹⁷. Algunas de estas cepas hipertransmisibles se caracterizan por presentar una isla de patogenicidad móvil y una mayor capacidad para desarrollar resistencia a los antimicrobianos. En los trabajos publicados se ha demostrado la adquisición tanto por pacientes relacionados como no relacionados y un posible desplazamiento de cepas que previamente estaban colonizando el tracto respirato-

rio¹⁸. La asistencia a campamentos y lugares de convivencia entre pacientes eleva el riesgo de adquisición de las cepas hipertransmisibles¹⁹ mientras que la aplicación de protocolos de segregación reduce la transmisión de paciente a paciente.

Fases de la colonización patogénica del tracto respiratorio en la fibrosis quística

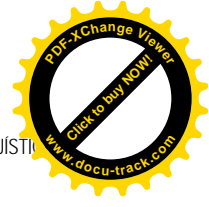
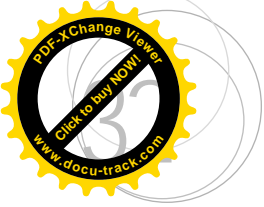
Similar a lo que acontece en los pacientes con EPOC, en la bronquitis crónica o en los pacientes con bronquiectasias, el aumento del número de microorganismos en las secreciones respiratorias se asocian con exacerbaciones. Este hecho ha mostrado una peor evolución clínica en los pacientes que están previamente colonizados por el mismo microorganismo, sobre todo por *S. aureus*, *H. influenzae* y *P. aeruginosa*. Como se ha indicado con anterioridad, la colonización/infección por estos patógenos produce un efecto inflamatorio en el epitelio bronquial que provoca la llegada masiva de neutrófilos. Sin embargo el efecto fagocítico de estas células se ve en parte limitado por la acción de los exoproductos liberados por los microorganismos (exopolisacáridos y enzimas proteolíticas). También se limita la fagocitosis por la tendencia al desarrollo en biofilms de estas bacterias²⁰.

El proceso de colonización-infección broncopulmonar en el paciente con FQ que más se ha estudiado es el de *P. aeruginosa* ya que es el que se asocia con mayor deterioro de la función pulmonar. Además, en la edad adulta más de un 80% de los pacientes están colonizados por este patógeno²¹. En la tabla 1 se resume esquemáticamente las diversas fases que se suceden habitualmente en la colonización por este patógeno, desde la primocolonización a la exacerbación³.

Primocolonización y colonización intermitente por *P. aeruginosa*. En algunos pacientes, la colonización inicial (primocolonización o colonización pione-

Tabla 1.
Características de los estadios de la infección-colonización por *P. aeruginosa* en el paciente con FQ
(tomado de la referencia 3)

Estadio de infección-colonización	Criterios microbiológicos	Criterios clínicos	Comentarios
Colonización inicial (primocolonización)	Detección del primer cultivo positivo de <i>P. aeruginosa</i> en el árbol bronquial.	No aparecen manifestaciones clínicas ni respuesta inmunológica específica	Colonias no mucosas con escasa diversidad de morfotipos y sensibles a antimicrobianos
Colonización esporádica o Intermitente	Cultivos intermitentemente positivos y negativos en muestras consecutivas tras colonización inicial: detección, en un periodo de 6 meses a partir de la colonización inicial, de un cultivo positivo por <i>P. aeruginosa</i> de entre al menos 3 cultivos separados al menos un mes entre ellos	No existen signos de infección o respuesta inmunológica patente	Pueden aparecer colonias mucosas y también otros morfotipos coloniales
Colonización inicial con infección broncopulmonar	Se utilizan los mismos criterios microbiológicos que en la colonización inicial o esporádica	Aparición de signos clínicos o inmunológicos de infección.	Colonias habitualmente no mucosas con escasa diversidad de morfotipos y sensibles a antimicrobianos En pacientes sin estudio microbiológico puede utilizarse como criterio diagnóstico la aparición o aumento de anticuerpos en dos muestras de sangre sucesivas separadas al menos por 3 meses
Colonización crónica	Cultivos positivos persistentes de <i>P. aeruginosa</i> : detección, en un periodo de 6 meses, de al menos 3 cultivos positivos por <i>P. aeruginosa</i> en muestras separadas entre sí al menos un mes	Ausencia de nuevos signos clínicos de infección pero con respuesta inmunológica consistente con la presencia de <i>P. aeruginosa</i>	Pueden aparecer colonias mucosas y otros morfotipos coloniales. Es el patrón habitual en periodos avanzados de la enfermedad
Infección broncopulmonar crónica (exacerbación)	Se utilizan los mismos criterios microbiológicos que en la colonización crónica	Signos clínicos de exacerbación o con respuesta inmunológica incrementada durante la colonización crónica	En pacientes sin estudio microbiológico puede utilizarse como criterio diagnóstico el aumento de anticuerpos en dos muestras de sangre sucesivas



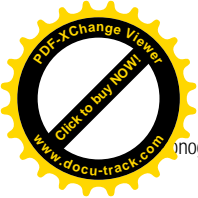
ra) por *P. aeruginosa* se produce antes de los tres primeros años de vida, aunque lo habitual es que suceda en edades más tardías. En los primeros momentos, se asocia al aislamiento de morfotipos no mucosos, generalmente sensibles a los antimicrobianos. En esta fase es posible la erradicación con tratamientos agresivos combinados (oral y en aerosoles)³. Tras el primer cultivo positivo de *P. aeruginosa* suele producirse un periodo denominado de colonización esporádica en la que los cultivos suelen ser intermitentemente positivos y negativos con aumento progresivo de los recuentos bacterianos. En esta fase la colonización suele ser escasa (poca superficie mucosa afectada) por lo que no siempre cultivos son positivos aunque si pueden detectarse los microorganismos aplicando técnicas de microbiología molecular. En la colonización intermitente pueden aparecer cepas mucosas que coexisten con otras con diferentes morfotipos coloniales. Los aislados suelen conservar su sensibilidad a los antimicrobianos de elección.

Colonización crónica por *P. aeruginosa*. Conforme avanza el proceso de colonización, *P. aeruginosa* genera gran cantidad de alginato y crece en biopelículas, dificultando el tratamiento con antimicrobianos y los procesos de defensa del hospedador, incluyendo la fagocitosis. Los cultivos son siempre positivos para *P. aeruginosa* y la colonización del pulmón es prácticamente permanente (colonización crónica), siendo casi imposible su erradicación. En estas condiciones, es fácil que se produzca una selección de clones específicos con mejor adaptación, que pueden persistir a lo largo de la vida del paciente con FQ, aún en los casos en los que se produce una falsa erradicación bajo tratamiento con antimicrobianos^{22,23}. A pesar de ello, se produce una diversificación con aparición de múltiples morfotipos, auxotrofías y perfiles diferentes de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos. Es en esta fase cuando, debido al estrés medioambiental y al crecimiento en biopelículas, es fácil que surjan variantes hipermutadoras que acumulan mayor resistencia a los antimicrobianos y por tanto mayor dificultad para su eliminación²⁴.

Desde el punto de vista de la patogénesis, durante la colonización crónica, se desarrolla una gran masa bacteriana en la superficie de la mucosa respiratoria, responsable en parte de las consecuencias patogénicas de la colonización (patogénesis pasiva) aunque también se liberan exotoxinas bacterianas capaces de alterar el epitelio respiratorio (patogénesis activa). Durante este periodo la respuesta inmunológica es consistente con la colonización por *P. aeruginosa* y suele evidenciarse un lento y progresivo deterioro de la función pulmonar. Es importante resaltar, que la colonización en el paciente con FQ es un proceso epimucosa ya que no se invade el parénquima pulmonar. De hecho los infiltrados en el tejido pulmonar son escasos así como las bacteriemias^{3,21}.

Estudios recientes aplicando técnicas de biotipado molecular han mostrado que a pesar de la persistencia clonal de *P. aeruginosa* durante la colonización crónica se producen modificaciones importantes en su genoma. Se han evidenciado procesos de microevolución con acúmulo de mutaciones y alteración de genes necesarios para la colonización inicial, como los flagelares²⁵. Esta situación podría favorecerse por la hipermutabilidad que caracteriza a los aislados de *P. aeruginosa* en estos pacientes²⁴.

Exacerbación por *P. aeruginosa*. Las exacerbaciones agudas durante la colonización crónica por *P. aeruginosa* se caracterizan por la aparición de signos clínicos de infección e incremento de los títulos de anticuerpos frente a este patógeno. Asimismo, suelen coincidir con aumentos de la masa bacteriana, objetivable cuando se realizan cultivos cuantitativos a partir de las secreciones respiratorias, o con variaciones antigénicas de las cepas que colonizan el árbol bronquial. En las exacerbaciones, al igual que sucede en los pacientes con bronquitis crónica tampoco puede excluirse la aparición transitoria de variantes bacterianas de mayor virulencia^{21,26}.



Dinámica de colonización por microorganismos diferentes de *P. aeruginosa*

Con el resto de los microorganismos habitualmente encontrados en el tracto respiratorio del paciente con FQ, el conocimiento del proceso de colonización es menor y no se ha prestado excesiva atención a situaciones de posibles primocolonizaciones. Este hecho sería importante en el caso de los microorganismos multirresistentes como *B. cepacia*, *S. maltophilia* o *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Aunque existen estudios que destacan un peor pronóstico de la enfermedad cuando se aíslan estos patógenos en otros trabajos no se ha asociado a un claro deterioro de la función pulmonar²⁷. No obstante podría depender del tipo de cepa y factores de virulencia asociados como es el caso de *B. cepacia* o de SARM o de la situación de la función pulmonar previa a la colonización. Recientemente se ha alertado del aislamiento de cepas de SARM capaces de producir la toxina PVL (Paton Valentine leucocidine) que en pacientes sin FQ previamente sanos provoca cuadros de neumonías necrotizantes muy agresivos y típicamente de adquisición extrahospitalaria¹¹.

Para *S. aureus* sensible a meticilina, *H. influenzae* o *S. pneumoniae*, la dinámica de colonización es algo diferente a la de *P. aeruginosa* ya que no siempre determinan estados de colonización crónica y cuando ésta se produce el recambio de cepas es más habitual. Como se ha indicado con anterioridad, es frecuente que estos microorganismos colonicen simultáneamente con *P. aeruginosa* el tracto respiratorio del paciente con FQ, por lo que es difícil establecer su papel real en el deterioro de la función pulmonar⁴.

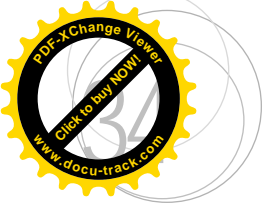
El estado de colonización crónico por *S. aureus* no siempre se produce por la misma cepa y es frecuente el recambio de cepas o la persistencia simultánea de diferentes clones. Desde el punto de vista de la resistencia a los antimicrobianos se ha descrito, al igual que en *P. aeruginosa*, una elevada proporción (aproxí-

madamente un 15%) de cepas hipermutadoras. Si bien no contribuyen al desarrollo de resistencia a la meticilina, puesto que ésta se produce por la adquisición de determinantes exógenos de resistencia y no por mutación, facilitan el desarrollo de resistencia a antibióticos como los macrólidos o las fluoroquinolonas. En muchos casos *S. aureus* aparece con un morfotipo de colonias enanas de mayor dificultad en su erradicación por su mayor resistencia a los antimicrobianos y facilidad para crecimiento en biopelículas. Estas podrían desarrollarse más fácilmente durante la cocolonización con *P. aeruginosa*²⁸.

Se han descrito pacientes con colonización crónica por *H. influenzae*, bien por cepas persistentes o por la sucesión de nuevas cepas con un patrón similar al que presentan los bronquíticos crónicos en los que persistentemente se aísla este patógeno a pesar de los ciclos continuos con antimicrobianos. Asimismo, se ha encontrado relación de este patógeno con las exacerbaciones durante el periodo de colonización crónica. Suelen ser generalmente breves, remiten con el tratamiento antimicrobiano adecuado e incluso puede erradicarse de las secreciones respiratorias hasta en el 70% de los casos²⁹. Las cepas de *H. influenzae* que colonizan crónicamente el tracto respiratorio del paciente con FQ tienen tasas de mutación elevadas y son proclives a la formación biopelículas^{6,30}.

Para *S. pneumoniae* también se ha demostrado la persistencia de clones, en muchos casos multirresistentes, que presentan tasas de mutación superiores a la de los aislados que no proceden de estos pacientes⁷. A diferencia de *P. aeruginosa* la persistencia de *S. pneumoniae* podría producirse a expensas del reemplazamiento sucesivo por nuevos clones. Ese hecho podría favorecer, tal y como se produce en los pacientes con bronquitis crónica, las exacerbaciones. Se ha demostrado una mayor facilidad de las cepas de *S. pneumoniae* aisladas del paciente con FQ para la formación de biopelículas que la que presentan aquellas que se aíslan de los pacientes con bacteriemia³¹.





Cocolonización en la fibrosis quística

Recientemente se ha prestado atención a los estados de cocolonización por diferentes patógenos para entender en parte la dinámica de los microorganismos en el árbol bronquial en los pacientes con FQ, el posible desarrollo de exacerbaciones y el deterioro de la función pulmonar⁴. Esta relación está limitada por la ausencia de estudios amplios que tengan como objetivo el estudio de los sistemas microbianos y las relaciones de los diferentes microorganismos que lo integran. No obstante, con la aplicación de técnicas de microbiología molecular es de esperar que este tipo de estudios puedan evaluar estos estadios, facilitando unas mejores estrategias de tratamiento.

En los estudios realizados con cultivos tradicionales se estima que hasta el 70% de los pacientes puede presentar más de uno de los patógenos clásicos²⁰. Se calcula que la media de diferentes patógenos por muestra de paciente es de 2.9 con un rango entre 0 y 10 patógenos, cifra que podría elevarse cuando se utilizan métodos moleculares.

La presencia de cocolonizaciones es probablemente debida a colonizaciones secuenciales más que a la adquisición simultánea de diferentes patógenos⁴. Son clásicas las afirmaciones de que una infección viral en el paciente con FQ determina una mayor facilidad para la colonización por *P. aeruginosa* y que la presencia de *S. aureus* en el tracto respiratorio puede retrasar la "llegada" de *P. aeruginosa*²¹. También existen evidencia de que la colonización por *P. aeruginosa* con morfotipo mucoso puede favorecer la aparición de *S. maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* o *Mycobacterium abscessus* y que también puede activar la expresión de factores de virulencia de *B. cepacia*.

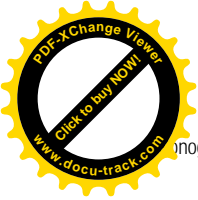
Otros microorganismos que pueden aparecer como cocolonizadores son las bacterias anaerobias y *Pneumocystis jirovecii* ambos con un papel patogénico de difícil adscripción^{9,32}.

Crecimiento en biopelículas, variantes coloniales e hipermutación

Dos aspectos ya señalados que caracterizan a los microorganismos que colonizan el tracto respiratorio en el paciente con FQ es la capacidad que presentan para la formación de biopelículas, la formación de variantes coloniales, incluyendo el morfotipo mucoso y en colonias enanas o *small colony variants* (SCV), y su carácter hipermutador. Nuevamente el modelo más estudiado en todos los casos es el de *P. aeruginosa* aunque también se forman biopelículas y aparecen fenotipos hipermutadores en *S. aureus*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae* y SCV en *S. aureus*.

La formación de biopelículas supone un cambio en la fisiología del crecimiento bacteriano y como consecuencia en la persistencia de los microorganismos y en una gran resistencia a la respuesta inmunitaria del paciente y a la acción de los antimicrobianos. En las biopelículas se produce un cambio en el estado de crecimiento de las células libres suspendidas en medio acuoso (crecimiento planctónico) al crecimiento en estructuras supracelulares o comunidades multicelulares complejas adheridas a una superficie (crecimiento sésil) y una ralentización de la división bacteriana. Esta transición está regulada por sistemas intercelulares de comunicación, también denominados de *quorum sensing*, que dependen de los operones *lasR-lasI* y *rhlR-rhlI*. Estos sistemas se activan cuando la población alcanza una determinada densidad de células y está favorecido por las condiciones de anaerobiosis parcial en las que se desarrolla el crecimiento bacteriano en la mucosa respiratoria. Otros reguladores que también participan en este proceso se asocian a sistemas de secreción que se activan durante la colonización crónica.

Parte de la población bacteriana en estas comunidades de *P. aeruginosa* con crecimiento sésil se desarrollan formando una cápsula de alginato que favorece la creación de una matriz que aumenta la consistencia de la biopelícula. También se produce a



partir de las células bacterianas una expulsión programada del DNA, de consistencia pegajosa, que da mayor estabilidad a esta matriz y dificulta aún más su eliminación del pulmón de los pacientes con FQ. No obstante, y en contra de lo esperado, la estructura de las biopelículas no es homogénea y se producen distintos ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta situación estimula aún más la formación de las biopelículas y favorece la formación de variantes fenotípicas características de la infección crónica por *P. aeruginosa*, entre los que destacan aquellos con hiperproducción constitutiva de alginato, responsable del morfotipo mucoso y los variantes de lento crecimiento con colonias enanas o SCV³³. Otras variantes fenotípicas que parecen favorecer la persistencia de las bacterias en las vías respiratorias son los mutantes aflagelados o con modificaciones del LPS. Se ha comprobado que el aislamiento de estos variantes se correlaciona con la producción de anticuerpos y cambios importantes en los parámetros pulmonares, asociándose con una mayor mortalidad. Por el contrario, en aquellos pacientes en los que no se produce la conversión a morfotipos mucosos se mantiene relativamente estable la funcionalidad pulmonar.

La resistencia a los antimicrobianos que ofrecen las bacterias con crecimiento sésil se debe por una parte a las dificultades que ofrecen la matriz de la propia biopelícula y la cápsula de alginato de las bacterias a la entrada de los antimicrobianos, al crecimiento ralentizado debido a la limitación de nutrientes y a la activación de respuestas de estrés que provocan la aparición de un fenotipo hipermutador. La cápsula de alginato en las cepas mucosas también bloquean los determinantes inmunológicos requeridos para la fagocitosis opsonica, por lo que se dificulta la acción de los antimicrobianos.

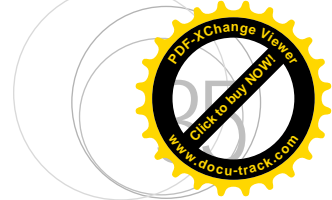
Desde un punto de vista fenotípico las bacterias hipermutadoras se caracterizan por una tasa de mutación espontánea significativamente superior a la normal (de 100 a 1000 veces). Genéticamente se debe a la alteración de genes que participan en los sis-

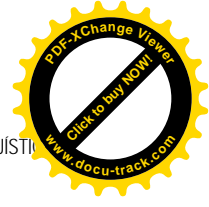
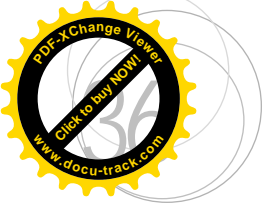
temas de edición durante la replicación del DNA o sistemas de reparación "mismatch" o MMR (*mutS*, *mutL* y *uvrD* o *mutU*) que determinan un proceso de intensa adaptación dirigido por la acumulación de múltiples mutaciones que, entre otras, favorece la persistencia largo tiempo con alta resistencia a los antibióticos y al sistema inmune y con virulencia reducida²³. Las condiciones particulares del nicho ecológico del pulmón del paciente con FQ y el tratamiento continuado con antibióticos puede ser considerados como factores de estrés que favorecen la selección y al aumento de la resistencia a los antimicrobianos. Este hecho se agrava en las infecciones crónicas con alto inóculo bacteriano, tal y como sucede en los pacientes con FQ. Con inóculos elevados el número absoluto de mutantes es mayor y es más sencilla su selección bajo el tratamiento antimicrobiano. En las cepas de *P. aeruginosa* de los pacientes con FQ se ha descrito una elevada frecuencia (43%) de cepas hipermutadoras, siendo incluso mayor (53%) en los pacientes con bronquiectasias crónicas²⁴. El proceso de intensa adaptación genética dirigido por la acumulación de múltiples mutaciones también favorece la persistencia ya que *P. aeruginosa* sufre un coste biológico disminuyendo su *fitness* y virulencia.

Recientemente se ha demostrado que el crecimiento en biopelículas de *P. aeruginosa* reduce los sistemas de protección de daño oxidativo, aumentando la mutabilidad (fenotipos hipermutadores) y la selección de mutantes resistentes³⁴.

Sepsis bronquial. Marcadores de inflamación locales y sistémicos

Durante años se ha especulado con que el sistema inmunitario del paciente con FQ presentaba alteraciones como consecuencia de la afectación del gen CFTR y que estas contribuían al deterioro final de la función pulmonar. Otros autores defienden que éste actuaría correctamente e incluso estaría hiperepre-



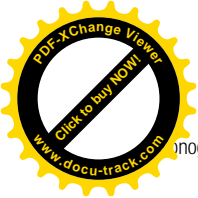


sado por la continua presencia de microorganismos en la mucosa respiratoria, creándose un círculo vicioso que haría difícil la erradicación de los microorganismos. No obstante, en los últimos años se han acumulado evidencias que demuestran que la alteración del CFTR no solo se produce en las células epiteliales del árbol bronquial, sino también en las células que participan en la respuesta inflamatoria, creándose un desbalance en la cascada de mediadores proinflamatorios^{2,35,36}. Al nacimiento, los pacientes con FQ demuestran una respuesta inmunológica celular adecuada. Sin embargo, existen estudios que demuestran que la inflamación está presente incluso en pacientes clínicamente estables. También se ha demostrado esta inflamación en niños diagnosticados por cribado neonatal de FQ a los pocos meses del nacimiento. Este hecho podría reflejar la posible presencia de microorganismos no detectados por técnicas de cultivo habituales y el fracaso de los sistemas pro y antiinflamatorios o también una alteración de la respuesta inmunitaria celular que afecta a la cascada de mediadores de la inflamación asociada a la propia disfunción del CFTR^{2,36,37}. Asimismo, en el caso de colonización por *P. aeruginosa*, existe una respuesta humoral normal y significativa dirigida frente a los antígenos de este microorganismo. Sin embargo, la exposición crónica a los antígenos de esta bacteria produce una falta de maduración de los anticuerpos anti-*P. aeruginosa* con lo que también disminuyen las posibilidades de su eliminación.

Un factor esencial en el deterioro pulmonar como resultado de la respuesta inflamatoria exagerada se debe al acúmulo masivo de células inflamatorias en el epitelio bronquial, esencialmente neutrófilos. Durante el proceso de colonización patogénica y como consecuencia de la interacción de los microorganismos con las células del hospedador se desencadena un reclutamiento masivo de neutrófilos con apariencia de infiltrado y una elevada síntesis de NF- β , o factor de transcripción nuclear. En *P. aeruginosa* se han reconocido diversos sistemas y componentes celulares que activarían la cascada de mediadores de la inflamación, entre ellos elementos de la pared (lipopoli-

sacárido) o componentes flagelares y sistemas de secreción tipo III (receptores Toll-like). No obstante, no parecen ser suficientes por sí mismos para explicar la hiperexpresión de los mediadores de la inflamación que se produce en la FQ y sería necesaria la participación tanto de los neutrófilos como de una alteración *per se* de los mediadores para producirse este efecto^{2,36}. El acúmulo de DNA liberado por la lisis de los neutrófilos incrementa la densidad y viscosidad de las secreciones, dificultando su eliminación. Además, los neutrófilos, mediante la secreción de proteasas, elastasas y productos oxidativos dañan aún más el tejido bronquial. También la secreción de estos productos estimula la producción de mucina, aumentando la viscosidad de las secreciones y obstrucción de la vía aérea, alterando los receptores fagocíticos en los macrófagos, aumentando la persistencia bacteriana y la persistencia de neutrófilos apoptóticos e induciendo una mayor secreción de mediadores que participan en el reclutamiento de los neutrófilos como la IL-8^{2,36}.

El hallazgo de neutrófilos en las primeras fases de la enfermedad carentes de una colonización estable podría sugerir un equilibrio entre la presencia de microorganismos y los procesos defensivos del huésped. En los pacientes con EPOC y FQ 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 leve. En los pacientes con FQ también se ha observado un aumento de macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y mastocitos que también contribuyen al proceso inflamatorio. Estas células, al igual que las del epitelio del árbol bronquial expresan CFTR, por lo que es posible que la alteración del CFTR también sea responsable de su elevación^{2,36}. 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 y mayor deterioro de la función pulmonar. No se descarta que las exacerbaciones puedan también estar iniciadas por otros es-



tímulos como la infección por agentes víricos o por los mismos patógenos clásicos.

Al igual que en los pacientes con bronquitis crónica y bronquiectasias, una vez activado el factor de transcripción nuclear se incrementa la síntesis de mediadores proinflamatorios liberados por las células epiteliales del árbol bronquial 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)³⁷. La alteración del CFTR podría también contribuir a un desorden final en la producción de citoquinas, alterando el balance que regula su producción. Recientemente se ha observado que la resistencia a la colonización crónica por *P. aeruginosa* requiere la liberación de IL-1 β , proceso modulado por el CFTR, no siendo funcional en las células con gen CFTR deficiente.

La excesiva respuesta inflamatoria se refuerza con una deficiencia parcial de mediadores antiinflamatorios secundaria a una menor síntesis de IL-10 y de óxido nítrico (NO) que dan lugar a su vez a una menor actividad del inhibidor de la proteína κ (Ik-B) que actúa como inhibidor de NF- κ B. Algunos de los factores que disparan este proceso inflamatorio han sido identificados aunque no explican la totalidad de los eventos y la situación de cada paciente. Tampoco está claro si éstos actúan como coadyuvantes o son los propios microorganismos los que generan de forma directa esta situación, aunque es probable que nuevamente se establezca un círculo vicioso de situaciones que termina por una hiperexpresión inflamatoria local. La disminución de la secreción de NO en las células epiteliales del tracto respiratorio parece ser secundaria a la disminución de factores de activación del propio NO^{2,35,38}. Algunos patógenos como *P. aeruginosa* favorecen claramente la liberación de citoquinas, particularmente IL-8, que actúan como mediadores inflamatorios y favorecen el infiltrado de neutrófilos. Sin embargo, el efecto fagocítico de estas células se ve en parte frustrado por la presencia de exoproductos de los microorganismos (exopolisacáridos y enzimas proteolíticas) y su crecimiento en for-

ma de biopelículas. Como se ha expresado anteriormente y al contrario de lo que sucede con la IL-8, la concentración de IL-10 está disminuida en el moco pulmonar. Esta citoquina regula la secreción de la anterior por lo que la estimulación de los neutrófilos y su reclutamiento es un proceso difícil de detener³⁷. Asimismo, en el paciente con FQ se producen deficiencias en la producción de reguladores de Ik-B como PPAR (*peroxisome proliferator activating receptor*) por parte de las células epiteliales del árbol bronquial, alterando el balance con NF- κ B^{2,36}.

Recientemente y utilizando cultivos de células con mutaciones típicas de la FQ se ha demostrado que, como consecuencia de la alteración del CFTR del retículo endoplásmico, se afecta el almacenamiento del Ca²⁺. Un aumento de éste provocaría, mediante la actuación de intermediarios (MAPK, mitogen activated protein kinase, e IKK), una alteración de los niveles de Ik-B y NF- κ B, facilitando la síntesis de IL-8 (Figura 1). Otra vía diferente que activaría la cascada de las citoquinas proinflamatorias se produciría mediante estrés oxidativo, también debido al intenso infiltrado de neutrófilos y a los productos liberados por éstos. Se generan compuestos oxidativos (ROS, *oxygen-derived reactive oxygen species*), en particular H₂O₂ que al igual que el calcio afecta a los niveles de IKK y finalmente a la síntesis de IL-8 (Figura 1).

Finalmente, en la FQ, similar a lo que ocurre en los pacientes con EPOC, además de los efectos inflamatorios locales descritos con anterioridad, también se han detectado alteraciones sistémicas de los mediadores de la inflamación³⁹. 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 de los episodios. En los pacientes con bronquiectasias no asociadas a FQ estos parámetros estarían casi inalterados en los períodos entre las exacerbaciones y podrían utilizarse como marcadores sistémicos. Asimismo, muy recientemente se ha observado que en los pacientes con colonización crónica por *P. aeruginosa* y tratados con azitromicina se produce una re-



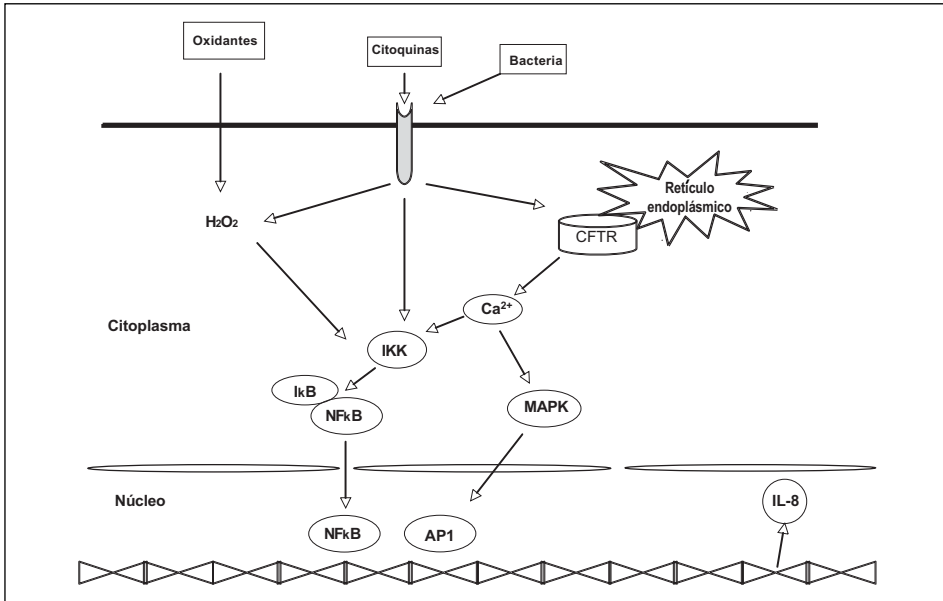


Figura 1.- Representación de los eventos principales que desencadenan el proceso inflamatorio exacerbado en las células epiteliales del tracto respiratorio en el paciente con fibrosis quística. El estímulo bacteriano (A), los diferentes mediadores de la inflamación (B) sobre receptores de superficie celular, el estrés oxidativo (C) o la alteración del Ca^{2+} del retículo endoplásmico por modificación del CFTR endoreticular ejercen una alteración de los reguladores de la síntesis final de interleuquinas, entre ellas IL-8 que estimula el reclutamiento de neutrófilos (ver texto para mayor explicación) (figura modificada de la referencia 36).

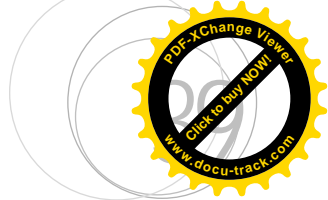
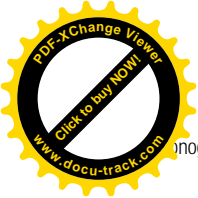
ducción de los niveles de la PCR, IL-8 y otros marcadores séricos de la inflamación como la proteína de unión del lipopolisacárido (LPS-binding protein) que evidenciaría también una alteración de los marcadores sistémicos de la inflamación ⁴⁰.

Conclusiones

La modificación del gen CFTR es responsable de las alteraciones que se producen en los pacientes con FQ y de la colonización de la mucosa del tracto respiratorio por microorganismos patógenos. Esta colonización se produce de forma casi secuencial por diferentes microorganismos, siendo *P. aeruginosa* uno de los más importantes desde el punto de vista de su frecuencia e implicación en el deterioro de la función pulmonar. Existen diversas hipótesis que tratan de ex-

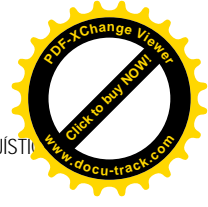
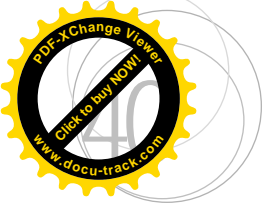
plicar el por qué de la colonización de la mucosa respiratoria, incluyendo una respuesta inmunitaria innata defectuosa, la producción de receptores específicos en la superficie de las células epiteliales, defectos en la internalización y eliminación fagocítica de los patógenos y la deshidratación y alteración de las defensas del moco respiratorio. En *P. aeruginosa* se ha demostrado la presencia de cepas hipertransmisibles que se asocian a un mayor deterioro pulmonar.

En el proceso de colonización patógena de la mucosa respiratoria por *P. aeruginosa* se pueden diferenciar diferentes fases que van desde su inicio (primocolonización) a una persistencia crónica, responsable en parte del deterioro funcional respiratorio. Contribuye decisivamente una inflamación local continua y exacerbada. Recientemente se ha comprobado que la alteración del CFTR es también responsable de parte del proceso inflamatorio exacerbado.

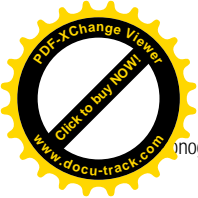


Bibliografía

1. Sibley CD, Rabin H, Surette MG. Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease. *Future Microbiol.* 2006; 1:53-61.
2. Jacquot J, Tabary O, Clement A. Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8:359-363.
3. Cantón R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, Alvarez A, Salcedo A, Oliver A, García-Quetglas E; 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.
4. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 2007; 153:917-923.
5. Valdezate S, Vindel A, Máz L, Baquero F, Escobar H, Cantón R. Persistence and variability of *Stenotrophomona maltophilia* in cystic fibrosis patients, Madrid, 1991-1998. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:113-122.
6. Román F, Cantón R, Pérez-Vázquez M, Baquero F, Campos J. 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: 1450-1459.
7. del Campo R, Morosini MI, de la Pedrosa EG, Fenoll A, Muñoz-Almagro C, Máz L, Baquero F, Cantón R; Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2207-2214.
8. Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremier N, Sarles J, Raoult D, Rolain JM. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS ONE* 2008; 3:e2908.
9. Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, Mateos I, Friaza V, Respaldiza N, Muñoz-Lobato F, Medrano FJ, Calderon EJ, Varela JM. Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1008-1011.
10. Baussano I, Tardivo I, Bellezza-Fontana R, Forneris MP, Lezo A, Anfossi L, Castello M, Aleksandar V, Bignamini E. Neonatal screening for cystic fibrosis does not affect time to first infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatrics* 2006; 11:888-895.
11. Elizur A, Orscheln RC, Ferkol TW, Atkinson JJ, Dunne WM Jr, Buller RS, Armstrong JR, Mardis ER, Storch GA, Cannon CL. Panton-Valentine Leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lung infection in patients with cystic fibrosis. *Chest* 2007; 131: 1718-1725.



12. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med* 2007; 58:157-170.
13. Campodónico VL, Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Uluer A, Pier GB. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med* 2008; 14:120-133.
14. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996; 85:229-236.
15. Schelstraete et al. *Eur Respir J* 2008; 31:822-829. Schelstraete P, Van Daele S, De Boeck K, Proesmans M, Lebecque P, Leclercq-Foucart J, Malfroot A, Vanechoutte M, De Baets F. *Pseudomonas aeruginosa* in the home environment of newly infected cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2008; 31:822-829
16. Festini F, Taccetti G, Mannini C, Campana S, Mergni G, Vignoli N, Allegretti N, Ravenni N, Cocchi P, Neri S, Rpetto T, de Martino M. Patient risk of contact with respiratory pathogens from inanimate surfaces in a cystic fibrosis outpatient clinic. A prospective study over a four-year period. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42:779-784.
17. Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, Al Nassafi K, Manos J, Elkins M, Bye P, Willcox M, Bell S, Wainwright C, Harbour C. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1697-1704.
18. 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.
19. Brimicombe RW, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, Kardoes I, Pitt TL, van den Broek PJ, Heijerman HG. Transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis attending summer camps in The Netherlands. *J Cyst Fibros*. 2008; 7:30-36.
20. Canton R, Oliver A, Baquero F. Microbiología de las vías respiratorias en la fibrosis quística. En: *Fibrosis quística: atención integral. Manejo clínico y puesta al día*. Dapena Fernández FJ (ed). Editorial Alhuila, Granada. 1998. Pp. 105-158.
21. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 194-222.
22. Munck A, Bonacorsi S, Mariani-Kurkdjian P, Lebourgeois M, Gerardin M, Brahimi N, Navarro J, Bingen E. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. *Pediatr Pulmonol* 2001; 32: 288-292.
23. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8487-8492.
24. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000; 288: 1251-1253.
25. Nguyen D, Singh PK. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:8305-8306.



26. Aaron SD, Ramotar K, Ferris W, Vandemheen K, Saginur R, Tullis E, Haase D, Kottachchi D, St Denis M, Chan F. Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 69: 811-815.
27. Govan JR, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol* 2007; 2:153-164.
28. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S, Gibson RL, Ramsey BW, Miller ST. 2006. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to the growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19890-19895.
29. Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax* 2007; 62:360-367.
30. Starner TD, Zhang N, Kim G, Apicella MA, McCray PB Jr. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 213-220.
31. García-Castillo M, Morosini MI, Valverde A, Almaraz F, Baquero F, Cantón R, del Campo R. 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.
32. Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, Wolfgang MC, Boucher R, Gilpin DF, McDowell A, Elborn JS. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:995-1001.
33. Schneider M, Mühlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, Zimmerli S. Clinical characteristics associated with isolation of small-colony variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1832-1834.
34. Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:1053-1056.
35. Rubin BK. CFTR is a modulator of airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L381-L382.
36. Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1703-1715.
37. Sagel SD, Chmiel JF, Konstan MW. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 406-417.
38. Elizur A, Cannon CL, Ferkol TW. Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest* 2008; 133: 489-495.
39. Levy H, Kalish LA, Huntington I, Weller N, Gerard C, Silverman EK, Celedón JC, Pier GB, Weiss ST. Inflammatory markers of lung disease in adult patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42:256-262.
40. Steinkamp G, Schmitt-Grohe S, Döring G, Staab D, Pfründer D, Beck G, Schubert R, Zielen S. Once-weekly azithromycin in cystic fibrosis with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Respir Med* 2008 Aug 11 [Epub ahead of print].

