



Diagnóstico y seguimiento microbiológico de la colonización respiratoria por *Pseudomonas aeruginosa* en fibrosis quística

Estrella Caballero Requero

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

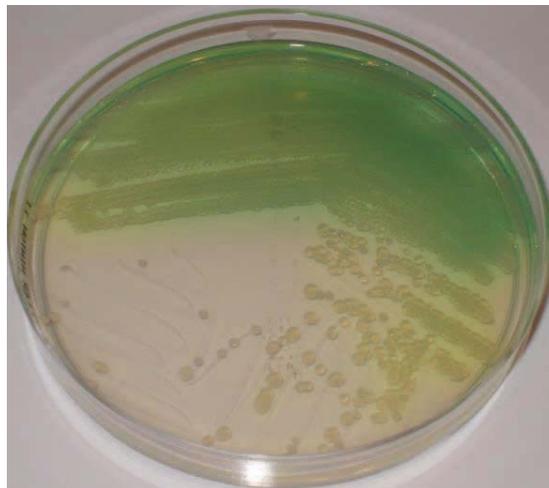
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Diagnóstico y seguimiento microbiológico de la colonización respiratoria por *Pseudomonas aeruginosa* en fibrosis quística



Tesis presentada por

Estrella Caballero Requero

Para obtener el título de doctora por la Universidad de Barcelona

Directora: Dra. Antonia Andreu Domingo

Tutor: Dr. Julià González Martín

Programa de Doctorado: Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona

2014

"Una señora honorable dice que conoce a la gente embrujada, si al frotarles en la frente, uno después nota un sabor salado en los dedos."

Primera descripción en español de uno de los principales síntomas de la Fibrosis quística, el sudor salado

**Juan Alonso y de los Ruyzes de Fontecha
Diez Privilegios para Mugeres Prenadas, 1606**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adelaida Ferrer sin cuyo trabajo durante muchos años como responsable de la Unidad de Respiratorio del Servicio de Microbiología de Hospital Vall d' Hebron de Barcelona no hubiera sido posible este trabajo.

A la unidad de Fibrosis Quística del Hospital Vall d' Hebron de Barcelona, y muy especialmente a la Dra. Silvia Gartner, por su colaboración imprescindible en la realización de este trabajo.

A los Dres. Francisco Fernández y Teófilo González, que en paz descansen, por su apoyo en los inicios de este trabajo.

A la Dra. Antonia Andreu Domingo, directora de este trabajo, y a los tutores Dres. María Teresa Jiménez de Anta y Julià González Martín, por su apoyo y consejo durante todos los años de realización de este trabajo.

A Josep M^a Manresa por su orientación en el análisis estadístico de este trabajo.

A Maite Barbero, Montse Aznar y Raquel Moreno por su ayuda en la realización de la parte técnica de este trabajo.

A Miguel por su paciencia.

Al mundo mundial.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	9
1.1.	Fibrosis quística	11
1.1.1.	Etiología	11
1.1.2.	Diagnóstico de la Fibrosis quística	16
1.1.3.	Patogenia	18
1.1.4.	Alteraciones respiratorias	20
1.1.5.	Microorganismos responsables de las infecciones respiratorias	23
1.1.6.	Susceptibilidad en pacientes con FQ a la colonización por <i>P.aeruginosa</i>	28
1.1.7.	Tratamiento en la Fibrosis quística	30
1.1.8.	Estrategias de tratamiento de las infecciones por <i>P.aeruginosa</i>	32
1.1.9.	Pronóstico	35
1.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y Fibrosis Quística	37
1.2.1.	Características generales de <i>P.aeruginosa</i>	37
1.2.2.	Principales componentes de <i>P.aeruginosa</i> con capacidad antigénica	39
1.2.3.	Proceso de colonización respiratoria por <i>P.aeruginosa</i> en pacientes con FQ	41

1.2.4.	Significado clínico de la colonización respiratoria por <i>P.aeruginosa</i> en la FQ	43
1.2.5.	Diagnóstico y seguimiento microbiológico de la colonización por <i>P.aeruginosa</i>	45
1.2.6.	Determinación de anticuerpos IgG anti- <i>P.aeruginosa</i> en pacientes con FQ	50
1.2.7.	Detección de DNA de <i>P.aeruginosa</i> en muestras respiratorias	61
2.	OBJETIVOS	69
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	75
3.1.	Muestras analizadas	77
3.2.	Muestras de pacientes estables microbiológicamente	78
3.3.	Muestras de pacientes con 24 meses de seguimiento analizado	79
3.4.	Procesamiento de muestras y controles	80
3.5.	Detección de <i>P.aeruginosa</i> por PCR en tiempo real	81
3.6.	Preparación de estándares para la PCR cuantitativa en tiempo real	83
3.7.	Detección de anticuerpos anti- <i>P.aeruginosa</i> por enzimoimmunoanálisis	84
3.8.	Análisis estadístico	87

4.	RESULTADOS	89
4.1.	Selección de las técnicas de PCR	91
4.2.	Análisis de las muestras de pacientes estables microbiológicamente	97
4.2.1.	Características de los grupos analizados	97
4.2.2.	Detección del DNA de <i>P.aeruginosa</i> . Comparación con el cultivo	106
4.2.2.1.	Cuantificación del DNA y diagnóstico de colonización	111
4.2.2.2.	Cuantificación del DNA y diagnóstico de colonización crónica	114
4.2.3.	Detección de anticuerpos anti <i>P.aeruginosa</i> . Comparación con el cultivo	117
4.2.3.1.	Título de anticuerpos y diagnóstico de colonización	120
4.2.3.2.	Título de anticuerpos y diagnóstico de colonización crónica	126
4.2.4.	Comparación entre detección del DNA, anticuerpos específicos y cultivo en el diagnóstico de colonización por <i>P.aeruginosa</i>	133
4.2.5.	Comparación entre la detección del DNA, anticuerpos específicos y cultivo en el diagnóstico de colonización crónica <i>P.aeruginosa</i>	139
4.3.	Análisis de las muestras de pacientes con 24 meses de seguimiento analizado	147
4.3.1.	Características de los grupos analizados	147
4.3.2.	Resultados del control microbiológico habitual durante los 24 meses de seguimiento analizado	153
4.3.3.	Resultados obtenidos en el diagnóstico de colonización por <i>P.aeruginosa</i>	157
4.3.3.1.	Detección del DNA mediante PCR de la secuencia <i>gyrB</i>	160
4.3.3.2.	Detección de anticuerpos frente al antígeno elastasa	164
4.3.3.3.	Resultados combinados de la detección del DNA mediante PCR de la secuencia <i>gyrB</i> y de anticuerpos frente al antígeno elastasa	167

4.3.3.4.	Resultados combinados de la detección de anticuerpos frente a los antígenos fosfatasa alcalina, elastasa y exotoxina A	169
4.3.3.5.	Resultados combinados de la detección del DNA mediante PCR de la secuencia <i>gyrB</i> y de la detección de anticuerpos frente a los antígenos fosfatasa alcalina, elastasa y exotoxina A	174
4.3.4.	Tiempo transcurrido hasta primer resultado positivo para la detección de DNA y anticuerpos anti- <i>P.aeruginosa</i> Comparación con los resultados del cultivo.	177
4.3.5.	Resumen de los mejores resultados de las pruebas individuales y combinadas	180
4.3.6.	Resultados de la detección de DNA y anticuerpos específicos en el diagnóstico de la colonización crónica por <i>P.aeruginosa</i> . Comparación con los resultados del cultivo	185
5.	DISCUSIÓN	191
6.	CONCLUSIONES	215
7.	BIBLIOGRAFÍA	219
8.	ANEXO. Experiencia previa publicada	233

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fibrosis quística

1.1.1. Etiología

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población de origen caucásico y la primera causa de patología pulmonar crónica en la infancia. La frecuencia estimada oscila entre 1/2.500 a 1/8.000 recién nacidos vivos, lo que establece una frecuencia de un portador por cada 25-50 individuos en la población general, aunque se observan importantes diferencias dependientes de los grupos étnicos y regiones geográficas. Estudios en España, desde la aplicación de programas de cribado han permitido observar que la prevalencia puede variar ampliamente según la zona de estudio. En Cataluña la prevalencia se estima en 1/5.352 recién nacidos¹.

La FQ se produce como consecuencia de mutaciones en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de fibrosis quística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR), situado en el brazo largo del cromosoma 7. El gen se identificó en 1989 y la proteína que codifica está formada por 1480 aminoácidos. Esta proteína una vez sintetizada es procesada en el sistema retículo-endotelial y el aparato de Golgi, donde es glucosilada y transformada, hasta llegar a su localización definitiva en la membrana celular. La proteína CFTR es miembro de la superfamilia de proteínas transportadoras de membrana fijadoras de ATP y corresponde a un canal de cloro regulado por el AMPc. El aumento de AMPc activa una proteína quinasa que fosforila la CFTR y provoca la apertura de los canales de cloro. Estudios fisiológicos *in vitro* han demostrado que mutaciones en el gen de la proteína CFTR pueden alterar su función en las células epiteliales de diferentes maneras, variando desde la pérdida completa hasta una expresión parcial de la misma con pobre transporte de cloro.

En 23 (Figura-1.1.1.1) de las más de 1.500 mutaciones asociadas a la enfermedad, y recogidas en la CF Mutation Database², existe evidencia directa o empírica de que provocan suficiente pérdida de funcionalidad de la proteína CFTR como para provocar la enfermedad y puede recomendarse como evidencia genética concluyente a efectos diagnósticos. Estas

mutaciones aparecen en ambos genes en el 85% de los pacientes con FQ y estos pacientes normalmente padecen insuficiencia pancreática (IP) y complicaciones pulmonares³.

Recommended panel of CF-causing mutations

Missense, deletion, stop mutations			Splicing, frameshift mutations	
G85E	I507del	R560T	621+1G>T	2789+5G>A
R117H	F508del	R1162X	711+1G>T	3120+1G>A
R334W	G542X	W1282X	1717-1G>A	3659delC
R347P	G551D	N1303K	1898+1G>A	3849+10kbC>T
A455E	R553X		2184delA	

Figura-1.1.1.1. Principales mutaciones causantes de FQ. Tomada de Farrell et al³. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report.

La mutación más frecuente, la delección en la posición F508, se produce por la pérdida del aminoácido fenilalanina en la posición 508. La incidencia de esta mutación en Europa es aproximadamente del 70% pero disminuye desde el norte al sur del continente. Varía considerablemente entre las diferentes poblaciones y localizaciones geográficas desde la incidencia más baja de Turquía (alrededor del 20%) y la más alta de Dinamarca (90%). Otras mutaciones suponen el 10-15% siendo las más frecuentes la G542X, N1303 y G551D Las dos primeras son más frecuentes en los países mediterráneos.

En España, 12 mutaciones se presentan con una frecuencia mayor del 1% siendo también la mutación F508del la más frecuente (51%). Otras mutaciones frecuentes son G542X, 1811 + 1.6kbA>G, 609delCA, V232D y 2789+5G>A. También la distribución geográfica es desigual, así la mutación F508del muestra una frecuencia que va del 86% al 46% desde el norte al sur de la península ibérica.⁴

En Cataluña, la incidencia de la mutación F508del estaría situada alrededor del 70%, mayor que la que presentan otras zonas como Castilla y León o Aragón (60%). Su presencia en alguno de los dos alelos en enfermos diagnosticados en Cataluña es del 84% mientras que en portadores está presente en el 61% (Tabla-1.1.1.1 y Tabla-1.1.1.2)⁵.

**Tabla-1.1.1.1. Mutaciones en enfermos diagnosticados en Cataluña
(Datos tomados del Dr. A. Maya, H. Clínico. Encuentros 2006, Fundación Sira Carrasco)**

Mutación F508del	54 (84%)
Homocigotos F508del / F508del	17 (31,5 %)
Heterocigotos F508del	37 (68,5 %)
G542X	5
N1303K	4
L206W	3
Q890X	2
E92K	2
R1066C	2
2183AA>G	2
Otras	17 (3DESC)
1078delT, 296+3insT, F587I, A561E, 3849+1G>A, W1089X, 1811+1,6kbA>G, 2789+5G>A, R347H, R347P, 2752-26A>G, 1812-1G>A, A1006E-5T, 3272-26A>G, CFTRdel20, desconocida (3)	
Otras mutaciones sin F508del en ningún alelo	10 (16 %)
G542X / R553X, N1303K / R334W, N1303K / L206W, N1303K / 3272-26A>G, 1811+1,6kbA>G / 2711delT, 711+1G>T / L206W, R347P / 2183AA>G, I507del / 1677delTA, I507del / Q890X, L227R / L227R	

**Tabla-1.1.1.2. Mutaciones en portadores diagnosticados en Cataluña
(Datos tomados del Dr. A. Maya, H. Clínico. Encuentros 2006, Fundación Sira Carrasco)**

Mutación F508 del	43 (61%)
Otras mutaciones	27 (39%)
R117H / -	7
G542X / -	4
711+1G>T / -	3
R334W / -	2
2183AA>G / -	2
Otras mutaciones	9
G85E, I507del, W1282X, R347H, R1162X, 1078delT, 2789+5G>A, 1609delCA, 3S549R	

El espectro del resto de mutaciones es muy variable y está representado por un elevado número de alelos raros recogidos en bases de datos como la “Cystic Fibrosis Mutation Database”².

Las diferentes mutaciones pueden alterar cualquiera de las fases tanto de síntesis, transporte, regulación o degradación de la proteína CFTR y, en función de ello, se han clasificado en diferentes clases según el efecto que producen (Fig. 1.1.1.2) ^{6,7,8}. Sin embargo algunas mutaciones pueden no encajar en esta clasificación o ser desconocida para algunas mutaciones muy raras.

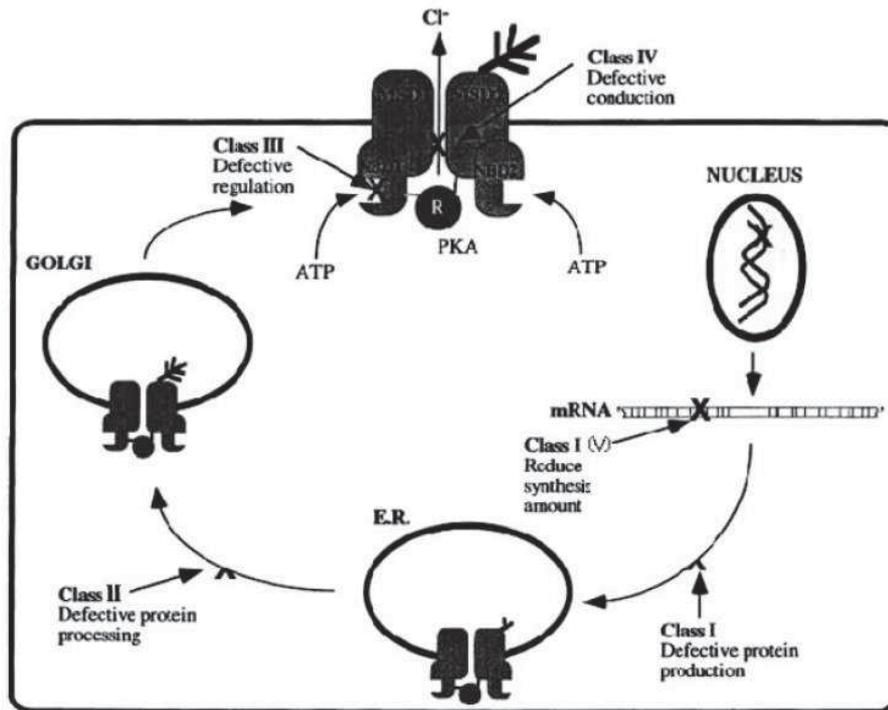


Figura-1.1.1.2. Clases de mutaciones de la Fibrosis Quística
Tomada de Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis ⁶.

- clase-1, cuando no se sintetiza proteína (mutaciones Nonsense: ej. G542X).
- clase-2, cuando hay un bloqueo en el procesamiento, con una degradación prematura y un fallo en alcanzar la membrana celular (Missense: ej. delF508)
- clase-3, cuando hay un bloqueo en la regulación con un descenso de la actividad (ej. G551D)
- clase-4, cuando hay una alteración en la conductancia (ej. R117H)
- clase-5 (también incluida como variante de la clase 1), cuando se observa una reducción en la síntesis o procesamiento de la proteína (ej. A455E).

Se ha propuesto una sexta clase que incluiría mutaciones que implican una labilidad de la proteína CFTR a la que le faltarían los 70–98 últimos residuos del extremo C-Terminal⁹. Aunque el extremo C-Terminal no es necesario para la biogénesis y la función del canal de cloro de la CFTR, al parecer sería indispensable para mantener la estabilidad de la CFTR glucosilada. Un ejemplo es la mutación Q1412X, que provoca la falta de 70 aminoácidos. En la Tabla 1.1.1.3 se resumen la clasificación de las distintas mutaciones implicadas en la FQ.

Tabla-1.1.1.3. Clasificación de las distintas mutaciones de la Fibrosis Quística

Clase	Tipo mutación	Alteración funcional de la proteína CFTR	Mutaciones
I	Nonsense	No síntesis	G542X, 711+1G→T, 1609delCA, R1162X, 1717-8G→A, W1282X, 1782delA, Q890X, 1898+3A→G, CFTRdele19, 936delTA
II	Missense	Procesamiento incorrecto. La proteína malformada no puede alcanzar la superficie de la célula	F508del, N1303K, I507del, R1066C
III	Missense	Regulación incorrecta. La proteína no responde a las señales químicas que la regulan	D1270N, G551D
IV	Missense	Conductancia incorrecta. No se transporta suficiente ion cloro a través del canal	L206W, R334W, R117H, R347H, D836Y, P205S
V	Missense	Disminución en la síntesis o procesamiento	A455E, 2789+5G→A, 1811+1.6kbA→G, 3849+10kbC→T, 3272+26G→A
VI	Nonsense	Labilidad. La proteína es eliminada rápidamente de la superficie celular	Q1412X

Las mutaciones “**missense**” son mutaciones puntuales en las que un cambio en un nucleótido, y por tanto en el correspondiente codón, origina un cambio de aminoácido que genera una proteína no funcional. En las mutaciones “**nonsense**”, una clase especial de

mutaciones missense, el cambio de nucleótido origina un codón de stop lo que genera una proteína incompleta y normalmente no funcional.

En las clases I, II y V no se produce suficiente proteína o no alcanza la superficie celular mientras que en las clases III, IV y VI la proteína se sintetiza y transporta hasta la superficie pero no funciona correctamente. Algunos pacientes con mutaciones pertenecientes a este segundo grupo tienen manifestaciones clínicas menos severas ².

La proteína CFTR se encuentra en todas las células epiteliales exocrinas. Cuando la CFTR está alterada, se produce un trastorno en la regulación de los canales de cloro. Esto provoca un descenso en la secreción de agua, manteniéndose la misma cantidad de proteínas, lo que conduce a una deshidratación de las secreciones de las glándulas sudoríparas, pancreáticas, hepáticas, intestinales, genitourinarias y del tracto respiratorio, aumentando la viscosidad de las secreciones y disminuye la motilidad del órgano afectado. El defecto en el transporte del ion cloro provoca que estos pacientes tengan un sudor característicamente salado con una concentración de NaCl 3–5 veces superior a lo normal y este parámetro se usa como prueba de diagnóstico de la enfermedad.

1.1.2. Diagnóstico de la FQ

El diagnóstico de FQ puede ser prenatal cuando se desea descartar la enfermedad en familiares de un paciente afecto de FQ, neonatal mediante cribado o clínico cuando existe sintomatología gastrointestinal o respiratoria compatible.

Diagnóstico prenatal. El estudio de las mutaciones del gen CFTR debe realizarse en los familiares de primer grado de los pacientes con FQ cuando se planteen la posibilidad de tener descendencia. Si los dos individuos son portadores de un alelo del gen CFTR, y se plantea la posibilidad de un aborto terapéutico en el caso de que el feto tenga dos mutaciones genéticas del gen CFTR, debe realizarse un estudio prenatal durante el embarazo por biopsia de las vellosidades coriónicas.

Diagnóstico neonatal. El diagnóstico neonatal permite aprovechar las ventajas de un diagnóstico y tratamiento precoz de la FQ. En 1979, se describió que la tripsina se encontraba anormalmente elevada en las edades precoces de la enfermedad, debido a la obstrucción de los conductos pancreáticos. Posteriormente otros estudios confirmaron estos datos, pero mostraron también que para obtener una sensibilidad del 85%, la tripsina inmunorreactiva (TIR) presenta una elevada tasa de falsos positivos. La identificación en 1989 del gen CFTR responsable de la FQ y de la mutación F508 hizo añadir el estudio genético del ADN al cribado con TIR en el despistaje de la FQ para mejorar la validez diagnóstica. Se han utilizado diversos protocolos de cribado de la FQ sólo con TIR o con TIR y ADN. Puesto que el valor predictivo positivo de la TIR sola es relativamente bajo, las estrategias que combinan TIR con una segunda prueba mejoran de modo significativo la sensibilidad y especificidad del cribado respecto a la estrategia que utiliza TIR sola. Actualmente en Cataluña se sigue ésta segunda estrategia combinando, siempre que es posible, la prueba de la TIR con una segunda prueba de TIR confirmatoria y en caso positivo un análisis genético del gen de la CFTR.

Diagnóstico clínico. Numerosos protocolos de pediatría definen una serie de situaciones clínicas que deben hacer sospechar la posibilidad de que el paciente padezca FQ. La más importantes serían: historia familiar (hermanos o primos) de FQ, íleo o peritonitis meconial, ictericia en el recién nacido de etiología no clara, alcalosis hipoclorémica o golpe de calor, fracaso del desarrollo, prolapso rectal, pansinusitis, pancreatitis recidivante, cirrosis inexplicable, colelitiasis, neumonía estafilocócica, presencia de *P.aeruginosa* mucóide en los pulmones, bronquiectasias u otras manifestaciones típicas de la FQ.

El estudio genético permite actualmente un diagnóstico definitivo en la mayoría de los pacientes, demostrando la existencia de más de 1.000 mutaciones conocidas actualmente como responsables de la enfermedad, pero no siempre es posible el estudio completo del gen. Para confirmar la enfermedad se realiza la prueba del sudor que consiste en provocar un exceso de sudor y medir su contenido en sal.

En los pacientes con FQ se obtienen cifras elevadas de cloro superiores a 60 mmol/l. Entre el 2-3,5% tenían valores por debajo de 60 y solo entre el 0,1-1,2% por debajo de 40.

Basándose en estos datos, los resultados de la prueba del sudor deben interpretarse siguiendo las recomendaciones de distintos paneles de expertos recogidas en la Tabla-1.1.2.1^{3,10}.

Tabla-1.1.2.1. Interpretación de la prueba de sudor en el diagnóstico de la Fibrosis Quística

Resultado de la prueba de sudor	Interpretación
>60 mmol/L	POSITIVA, indicativa de Fibrosis quística
40 a 59 mmol/L	INDETERMINADA, periódicamente se debe repetir la prueba y evaluar clínicamente al paciente cada 6-12 meses
<39 mmol/L en niños >6 meses y adultos <29 mmol/L en niños <6 meses	NORMAL, FQ poco probable

El documento de consenso sobre diagnóstico de la FQ avalado por la Fundación Americana de Fibrosis Quística recomienda que el diagnóstico debe basarse en uno de los siguientes criterios: uno o más rasgos fenotípicos característicos o historia de fibrosis quística en hermano o primo hermano, o despistaje neonatal positivo, más una evidencia de disfunción del gen CFTR demostrada por: concentración de cloro en sudor elevada en dos o más ocasiones, identificación de 2 mutaciones causantes de la enfermedad o diferencia de potencial nasal anormal¹¹.

1.1.3. Patogenia

La naturaleza de las mutaciones se correlaciona claramente con el grado de anormalidad del cloro en el sudor y la gravedad de la alteración pancreática. Los pacientes con insuficiencia pancreática son homocigotos o heterocigotos compuestos para dos mutaciones ‘severas’, mutaciones de las clases I, II o III. Otras mutaciones, por ejemplo R117H, R334W y R347P, se asocian usualmente con una afectación de la función pancreática menos severa.

La relación entre el genotipo y el fenotipo pulmonar es menos patente probablemente debido a una mayor influencia de las distintas variables genéticas (tipo y posición de las mutaciones en el gen, otros factores intragénicos o la influencia de otras mutaciones) y los

factores ambientales (7). Aunque sí se ha observado que en homocigotos para la mutación del codón F508del, la infección pulmonar es más agresiva¹².

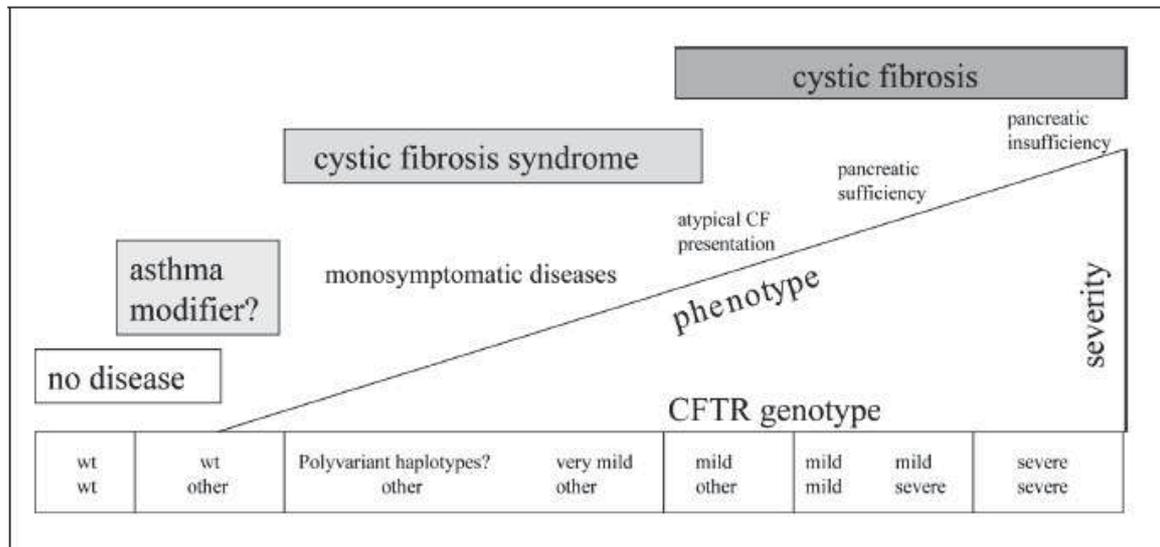


Figura-1.1.3.1. Espectro de fenotipos de afectación asociados a la mutación del Gen de la CFTR. Tomada de J. Zielenski, Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis ⁷ wt= wild type, other= very mild, mild or severe.

Como consecuencia de estas alteraciones, las principales manifestaciones clínicas (Figura-1.1.3.1) se producen en el aparato respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. Las alteraciones gastrointestinales y genitourinarias se comentan brevemente a continuación mientras que las del aparato respiratorio se exponen con más detalle en el apartado siguiente.

Las alteraciones gastrointestinales incluyen la insuficiencia pancreática, que provoca una mala absorción de las grasas y proteínas, y diversas alteraciones en el metabolismo de la glucosa, lo que produce alteraciones en el crecimiento normal de los niños con FQ. La manifestación clínica más temprana de la FQ a nivel gastrointestinal es el íleo meconial neonatal, una obstrucción del intestino distal provocada por la acumulación de un meconio extremadamente viscoso y que ocurre en un 10–20% de los neonatos con FQ. Es muy rara en pacientes sin FQ y es por tanto prácticamente diagnóstico de FQ. La ausencia de íleo meconial en el 80–90% de los pacientes con FQ sugiere la existencia de otros genes implicados en modular el fenotipo y la severidad de la enfermedad entre individuos con el

mismo genotipo. Otras alteraciones gastrointestinales son el prolapso rectal, síndrome de la obstrucción intestinal distal, edema hipoproteínico, ictericia neonatal prolongada, cirrosis biliar con hipertensión portal, deficiencia de vitaminas (A, D, E, K), pancreatitis recurrentes, diabetes mellitus y enfermedad hepática relacionada con la FQ.

Las alteraciones gastrointestinales fueron las principales responsables de la temprana mortalidad de estos pacientes hasta mediados del siglo pasado, determinando que hasta el 70% de los niños con FQ falleciera antes de cumplir el primer año de vida (expectativa de vida <1 año en 1960). La instauración de tratamientos específicos para corregir las deficiencias digestivas en primera instancia, seguida posteriormente de la aplicación de tratamientos efectivos para combatir las infecciones respiratorias por *Staphylococcus aureus*, el primer patógeno asociado a la FQ, determinó un aumento notable de la esperanza de vida de los pacientes FQ, situada actualmente en los 36,8 años según el informe del 2011 de la Fundación Americana para la Fibrosis Quística¹³.

Entre las alteraciones del aparato genitourinario destacan los trastornos en el transporte del espermatozoides, que determinan que más del 95% de los varones con FQ sean estériles, como consecuencia de la obstrucción de los vasos deferentes. Un número importante de mujeres con FQ también sufre fertilidad reducida, debido posiblemente a las propiedades alteradas del moco cervical.

1.1.4. Alteraciones aparato respiratorio

La actividad mucociliar en el tracto respiratorio constituye una de sus principales barreras de defensa frente a microorganismos y otros elementos extraños. De una forma mecánica, el epitelio ciliado transporta la secreción mucosa por el árbol traqueo-bronquial arrastrando a su paso cualquier partícula o microorganismo que encuentre en su camino. Para que este mecanismo sea efectivo, la secreción tiene que tener una composición equilibrada entre la parte acuosa y los mucopolisacáridos que contiene. De esta forma, el moco, que ocupa la parte central de la vía, puede deslizarse sobre la superficie que envuelve los cilios de las células del epitelio bronquial, consiguiendo una lubricación adecuada en las vías aéreas.

En los pacientes con FQ, la disfunción del CFTR provoca un aumento de la reabsorción de cloro y sodio que implica una reabsorción pasiva de agua. Ello implica una secreción mucosa mucho más densa y viscosa y una deshidratación de la superficie del epitelio ciliado respiratorio, impidiendo el correcto deslizamiento del moco a través del árbol traqueo-bronquial. El moco no se elimina correctamente y sirve de caldo de cultivo idóneo para diversos microorganismos. Por otra parte, la secreción serosa que se forma en individuos sanos en respuesta a la presencia de agentes extraños no se produce en los pacientes con FQ. También se ha propuesto que el aumento de la osmolaridad del moco provocaría la inactivación de las β -defensinas, péptidos antibacterianos naturales que forman parte del sistema inmune innato. El aumento de la viscosidad de las secreciones bronquiales y el aclaramiento mucociliar defectuoso facilita la colonización de las vías aéreas periféricas. La presencia crónica de microorganismos contribuye a su vez a la alteración del moco mediante la secreción de sustancias que lo hacen todavía más denso y viscoso.

Otro factor patogénico añadido es la existencia de una respuesta inflamatoria exagerada, causada por la propia infección y por la alteración del epitelio bronquial y que se manifiesta principalmente por un intenso infiltrado de neutrófilos. La secreción de proteasas por parte de los neutrófilos daña aún más el tejido bronquial y por otra parte su lisis provoca un acumulo de ADN que aumenta la densidad y viscosidad de las secreciones. En las fases iniciales de la enfermedad, carentes de colonización o infección por los patógenos típicos que afectan a estos enfermos, el hallazgo de neutrófilos indica un equilibrio inicial entre la presencia de microorganismos y los procesos defensivos del huésped, ya que el sistema inmune de los pacientes con FQ es normal. Conforme avanza la enfermedad, la predisposición del paciente con FQ a padecer infecciones desequilibraría esta situación. La presencia de microorganismos en las vías respiratorias, especialmente *P.aeruginosa*, favorece la liberación de citoquinas, particularmente IL-8, que activa la llegada de neutrófilos. Sin embargo, el efecto fagocítico de estas células se ve en parte frustrado por el crecimiento de los microorganismos en forma de biopelículas o por su capacidad para liberar exoproductos (exopolisacáridos y enzimas proteolíticas). Por otra parte, la baja concentración en el moco de IL-10, que regula la producción de IL-8, impide detener la estimulación de los neutrófilos y la respuesta inflamatoria se perpetúa contribuyendo al daño del epitelio respiratorio.

Por tanto, debido a todos estos factores, el paciente con FQ padecerá un cuadro de infección bronco-pulmonar crónica que se irá exacerbando a lo largo de su vida. Una exacerbación se define por la presencia de al menos cuatro de estos hechos: aumento de la tos y/o dificultad respiratoria, cambios en el aspecto o en el volumen de la expectoración, nuevos signos a la auscultación, nuevos hallazgos radiológicos, pérdida del apetito, fiebre y disminución de la función pulmonar. Probablemente el hecho más informativo es la caída de un 10% o más del volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) más dos o más signos de empeoramiento de los síntomas respiratorios de vías aéreas bajas.

En el lactante, las alteraciones respiratorias pueden ser la primera manifestación, con tos, broncoespasmo o bronconeumonías de repetición. Algunos niños pueden tener atrapamiento de aire con aumento del diámetro antero-posterior del tórax, no siendo raro que sean diagnosticados de asma. En este periodo suelen aparecer los primeros síntomas de insuficiencia pancreática. Los niños dejan de ganar peso, crecen más lentamente y tienen una moderada distensión abdominal. Durante la edad preescolar y escolar, el cuadro clínico es más florido y las manifestaciones respiratorias están presentes en el 85% de los casos. En esta edad predominan las bronconeumonías de repetición y los cuadros de atelectasia por tapones de moco. En los adolescentes y adultos aparecen complicaciones como aspergilosis broncopulmonar alérgica (5%), asma (20%), neumotórax (5%), hemoptisis masiva (7%) y poliposis nasal (15%). En las fases más avanzadas de la enfermedad están presentes las bronquiectasias, fibrosis peribronquial, obstrucción bronquial, hipertensión pulmonar y cor pulmonale.

A pesar de los avances en la antibioterapia y en el tratamiento con agentes mucolíticos y enzimas que fragmentan el ADN acumulado, la infección bronco-pulmonar crónica sigue siendo la principal responsable de la peor calidad y menor expectativa de vida de los pacientes con FQ. La lesión pulmonar evoluciona hacia una insuficiencia respiratoria cuya gravedad depende de la reiteración de las infecciones y que puede llevar a la necesidad de un trasplante pulmonar.

1.1.5. Microorganismos responsables de las infecciones respiratorias

Los microorganismos responsables de las infecciones respiratorias en los pacientes con FQ son principalmente bacterias como *P.aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, aunque la infección pulmonar también puede deberse a clamidias, micoplasmas, virus^{14, 15} micobacterias no tuberculosas, levaduras y hongos, principalmente *Aspergillus*.^{12, 16, 17, 18, 19}.

En las fases tempranas de la enfermedad los patógenos más frecuentes son *S.aureus*, *H.influenzae* y *S. pneumoniae*. El primer microorganismo identificado como causante de infección pulmonar crónica en pacientes con FQ fue *S.aureus*. Antes del empleo de antibióticos fue la principal causa infecciosa de la elevada y precoz mortalidad de estos pacientes. La terapia anti estafilocócica ha conseguido una importante reducción de la morbilidad y mortalidad por este microorganismo, pero aún sigue siendo, después de *P.aeruginosa*, uno de los principales patógenos implicados en la infección broncopulmonar, especialmente en niños menores de 10 años y sobre todo en el grupo de edad comprendido entre los 6 y los 10 años donde puede llegar a afectar al 75%. Los datos de 2011 del registro de pacientes de la Fundación Americana de Fibrosis Quística muestran que, de forma global, el 67% de los pacientes están colonizados por *S. aureus*¹³.

La persistencia de *S.aureus* en el aparato respiratorio de los pacientes con FQ se explica fundamentalmente por su facilidad para crecer adecuadamente en medios con alta osmolaridad, su capacidad de adhesión al epitelio respiratorio y la incapacidad de la respuesta inmunitaria para eliminarlo, una vez se ha producido la colonización. En el paciente con FQ, *S.aureus* puede llegar a persistir en las vías respiratorias sin producir alteraciones aparentes, sin embargo probablemente causa una lesión inicial con escasa repercusión funcional que predispondría a la colonización posterior por *P.aeruginosa*. Si bien el tratamiento profiláctico con antibióticos β -lactámicos ha mejorado notablemente el pronóstico de los niños con FQ, sigue existiendo cierta controversia en torno al tratamiento indiscriminado ya que un tratamiento prolongado podría llevar a la sustitución de *S.aureus*

por *P.aeruginosa* y por tanto a adelantar el proceso evolutivo de la infección crónica y el deterioro pulmonar.

H.influenzae es el tercer microorganismo más frecuentemente aislado en los pacientes con FQ después de *P.aeruginosa* y *S.aureus*. Puede colonizar a más del 30% de los pacientes y su incidencia es mayor en los niños de menor edad, principalmente entre 2 y 5 años, aunque también puede aislarse en pacientes adultos. Parece que no tiene un papel primario en el deterioro de la función pulmonar y su efecto patogénico estaría relacionado con una carga bacteriana elevada y la correspondiente respuesta inflamatoria. De todas formas, los pacientes que presentan aislamientos repetidos de *H. influenzae* podrían tener mayor posibilidad de aceleración de la colonización por *P. aeruginosa*.

S.pneumoniae se aísla con menor frecuencia en las secreciones broncopulmonares de los pacientes con FQ. En la mayoría de las series, su incidencia no supera el 20%, siendo superior en las etapas iniciales de la enfermedad en las que puede llegar hasta el 50%.

La infección pulmonar crónica en el paciente con FQ se asocia con un número limitado de microorganismos siendo *S.aureus* y *P.aeruginosa* los más frecuentes. *P.aeruginosa* puede aislarse en cerca del 80% de los enfermos adultos¹³, en la mayoría de los casos asociada con una colonización-infección crónica. *P.aeruginosa* acaba desplazando a los demás, colonizando de forma permanente el pulmón del paciente y asociándose a un deterioro respiratorio cada vez más pronunciado conforme se cronifica la infección.

En los últimos años se ha incrementado el aislamiento de otros patógenos, algunos de ellos bacterias multirresistentes, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* y *Achromobacter xylosoxidans* que afectarían aproximadamente en su conjunto a menos del 25% de los pacientes. *S.maltophilia* y *A. xylosoxidans* se encuentran más frecuentemente que *B. cepacia* complex en pacientes con FQ con enfermedad pulmonar avanzada pero generalmente son menos virulentos que las bacterias del complejo cepacia.

S.maltophilia es un bacilo Gram negativo no fermentador, oxidasa negativa y resistente a la mayoría de los antimicrobianos. Hay factores que predisponen a la

colonización por este microorganismo como el uso crónico de antimicrobianos orales, intravenosos o en aerosol. Se aísla globalmente en menos del 15% de los pacientes con FQ¹³. Muchos pueden presentar una colonización transitoria y solo un 10% están colonizados crónicamente. En un estudio se observa una peor supervivencia a los 5 años de los pacientes con *S.maltophilia*, sin embargo, en otros no se evidencia un deterioro clínico asociado con esta bacteria.

B.cepacia es un bacillo Gram negativo, originalmente denominado *Pseudomonas cepacia*, que agrupa un complejo de al menos 9 variedades genómicas fenotípicamente similares. La mayoría de los aislamientos en pacientes con FQ se incluyen dentro de las genovariedades *B.cenocepacia* y *B.multivorans*. Los pacientes pueden presentar colonización intermitente o transitoria pero la infección pulmonar producida por estas bacterias es con frecuencia crónica, difícil de tratar con antimicrobianos debido a su multirresistencia, y se asocia con alta morbilidad y mortalidad. En estos pacientes. *B.cepacia* se ha asociado con el denominado síndrome cepacia que se caracteriza por fiebre alta, bacteriemia, bronconeumonía, deterioro pulmonar rápido y muerte en más del 62% de los pacientes.

A. xylooxidans es también un bacilo Gram negativo que puede confundirse con *P. aeruginosa* no pigmentadas o con *B. cepacia*. No hay estudios que examinen el efecto de esta bacteria en la función pulmonar y en la mortalidad. No parece que la colonización a largo plazo produzca un deterioro claro del estado clínico.

Más recientemente se ha comunicado la identificación de nuevos microorganismo en las secreciones respiratorias de estos pacientes, aunque su importancia patogénica es incierta. Entre ellos destacan *Inquilinus limosus* y diversas especies de los géneros *Pandora*, *Raslstonia* y *Burkholderia*.

Otros patógenos que pueden encontrarse ocasionalmente en las secreciones del paciente con FQ son las enterobacterias aunque raramente colonizan crónicamente el árbol bronquial. Generalmente son colonizadores transitorios que se aíslan de forma poco frecuente. Se encuentran en baja densidad de colonización y en general no están asociados con enfermedad grave. Se pueden encontrar entre el 1-4% de los pacientes con FQ y en 10%

de los casos de exacerbaciones agudas. Se aíslan con mayor frecuencia en niños menores de 5 años antes de que se produzca una colonización crónica por *P.aeruginosa*. Dentro de las Enterobacterias, *E.coli* es la que se aísla con mayor frecuencia seguido de *Klebsiella spp.*

Ocasionalmente pueden aislarse las denominadas micobacterias atípicas o micobacterias no tuberculosas (MNT). Los pacientes con FQ tienen un riesgo mayor de sufrir colonización-infección respiratoria por MNT pero la prevalencia puede variar ampliamente del 2 al 28%. Las especies que se aíslan más frecuentemente son *M.avium complex* (MAC), *M.avium* con mayor frecuencia que *M.intracellulare*, seguida de *M.abscessus*. La edad de los pacientes parece influir en la frecuencia y especies de MNT aisladas. En menores 10-12 años la prevalencia sería del 4-5% y la más frecuente *M.abscessus* junto con otras MNT de crecimiento rápido miembros del antiguo grupo *M.fortuitum complex*, *M.chelonae* y *M.fortuitum*. La prevalencia va aumentando con la edad siendo superior al 15% en mayores de 15 años. En bastantes pacientes la colonización es ocasional ya que los cultivos repetidos son negativos, sobre todo en el caso de *M.avium*. El aislamiento repetido de MNT se asocia significativamente con enfermedad pulmonar granulomatosa diagnosticada por necropsia en pacientes con FQ, sobre todo en los pacientes con aislamiento de *M.abscessus*. En aproximadamente dos tercios de los pacientes con *M.abscessus* se observan alteraciones en el TAC y se han descrito con mayor frecuencia casos de enfermedad invasiva mortal. *M.abscessus* puede además ser la responsable de infección diseminada tras el trasplante pulmonar y la posterior terapia inmunosupresora. Dentro del grupo MAC, *M. intracelullare* se asocia con cultivos repetidamente positivos más frecuentemente que *M.avium*. Se ha observado un mayor número de anormalidades en el TAC entre los que tenían múltiples aislamientos en el esputo.

La colonización respiratoria por hongos filamentosos y levaduras es muy frecuente en los pacientes con FQ. *Aspergillus* está ampliamente distribuido en el medio ambiente y es muy difícil establecer medidas preventivas para evitar la exposición a sus esporas. La prevalencia de *Aspergillus* en muestras respiratorias de pacientes con FQ varía desde el 6 al 57% dependiendo de la edad (suele aparecer durante la adolescencia), el lugar de residencia (afecta más a pacientes del medio rural) o las condiciones climáticas (mayor incidencia en

zonas costeras). En aproximadamente el 75% persiste en cultivos sucesivos y su aislamiento normalmente representa colonización pulmonar. En el 2-10% de estos pacientes la principal complicación es la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), una hipersensibilización a los antígenos de *Aspergillus* con estimulación de la respuesta inmune celular y producción de anticuerpos específicos.

Las levaduras se aíslan con mayor frecuencia, 75-78% de los pacientes con FQ, siendo *Candida albicans* la especie mayoritaria. Se asocia a pacientes que reciben tratamiento prolongado con antibióticos o glucocorticoides y el origen es principalmente endógeno a partir de la propia flora del paciente. Otros hongos a los que se les ha dado importancia epidemiológica reciente son *Scedosporium apiospermum* que podría favorecer un síndrome similar al ABPA y *Pneumocystis jiroveci* que podría comportarse exclusivamente como colonizador.

A pesar del papel central de las infecciones bacterianas, principalmente por *P.aeruginosa*, existen otros microorganismos no bacterianos implicados en la progresión de la enfermedad pulmonar en los pacientes con FQ. Durante la última década se ha evaluado en estos pacientes el impacto de las infecciones por virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, adenovirus, virus parainfluenza, rinovirus y más recientemente metapneumovirus pero no por otros virus responsables de infecciones respiratorias como coronavirus o bocavirus, un miembro de la familia *Parvoviridae* recientemente descrito.

También se ha considerado la implicación de bacterias atípicas como *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *Legionella pneumophila*. En general, en el 5-20% de pacientes con exacerbaciones agudas se puede demostrar una etiología vírica o por las bacterias señaladas frente al 0-5% en pacientes en situación estable. En menores de 5 años hay una mayor incidencia de infecciones víricas del tracto respiratorio inferior por lo que cabe pensar que también la haya en niños con FQ. La incidencia en estos pacientes no es mayor que en la población general y en niños menores de 2 años incluso más baja, debido probablemente a una exposición menor. Sin embargo, la infección respiratoria puede ser mucho más grave con mayor afectación de vías bajas, mayor incidencia de exacerbaciones agudas, hospitalización y deterioro de la función pulmonar. Además, puede

predisponer a la infección por bacterias al dañar el epitelio respiratorio y facilitar la adherencia bacteriana.

En resumen, las colonizaciones o infecciones en los pacientes con FQ sigue una secuencia más o menos establecida dependiente de la edad. En los estadios iniciales los patógenos son diferentes a los que se aíslan en los periodos finales. En los de menor edad, las infecciones por virus respiratorios y micoplasmas no serían infrecuentes sin diferencias significativas con respecto a niños sanos de igual edad pero sus efectos sobre el epitelio respiratorio favorecerían colonizaciones posteriores por otros patógenos. La colonización por estos microorganismos estimularía la respuesta inflamatoria en el trato respiratorio que puede evidenciarse incluso antes de aislarse los patógenos clásicos. En la primera década de la vida, es frecuente el aislamiento de *S.pneumoniae* y *H.influenzae* que serían substituidos por *S.aureus*. El aislamiento de *P.aeruginosa* y la subsiguiente colonización-infección crónica se asocia con una peor función pulmonar, sobre todo cuando se aísla en su morfotipo mucoso. El tratamiento antimicrobiano repetido favorece el desplazamiento de los patógenos bacterianos habituales. Se aíslan cada vez con mayor frecuencia bacilos Gram negativo no fermentadores como *S.maltophilia*, *Achromobacter* spp y *B.cepacia*, así como levaduras y hongos filamentosos que complican aún más el patrón de colonización bronquial. El hallazgo de micobacterias no tuberculosas no es infrecuente aunque sólo el aislamiento continuado podría tener significación clínica.

Por último, es importante señalar que el patrón de colonización bronquial no siempre es monomicrobiano y hasta en el 70% de los pacientes pueden coexistir diferentes patógenos. En más del 50% de ellos aparecen simultáneamente *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

1.1.6. Susceptibilidad de los pacientes con FQ a la colonización por *P.aeruginosa*

La colonización-infección por *P. aeruginosa* no es específica de fibrosis quística, pero es más frecuente en fibrosis quística que en otras enfermedades caracterizadas por la obstrucción crónica de las vías respiratorias. Se ha sugerido que la alteración de la composición iónica del fluido de la superficie de las vías respiratorias puede ser el factor clave que explique por qué una flora microbiana similar no aparece en otras enfermedades

con características similares²⁰. La proteína CFTR alterada parece tener un papel importante en la hipersusceptibilidad de los pacientes con FQ a las infecciones pulmonares. Varias hipótesis, no sin cierta controversia, intentan justificar la enorme predisposición de los pacientes FQ para la infección broncopulmonar crónica por patógenos bacterianos concretos, particularmente por *P.aeruginosa*. Entre ellas cabría destacar especialmente los siguientes:

1- La alteración de la CFTR conduce a la deshidratación de las secreciones respiratorias aumentando de forma notable su osmolaridad, lo cual determina la inactivación de las β -defensinas, péptidos antibacterianos naturales que forman parte del sistema inmune innato.

2- Las células que expresan la proteína CFTR alterada tendrían también un defecto en la internalización de *P.aeruginosa*, paso previo para su destrucción.

3- Las células epiteliales de los pacientes con FQ son, como consecuencia de la alteración de la CFTR, deficientes en la sialización de gangliósidos. Los asialogangliósidos actúan como receptores para *P. aeruginosa* aumentando su adhesión al epitelio. En el epitelio respiratorio de los pacientes con FQ existirían, por tanto, un mayor número de receptores asialogangliósidos para *P.aeruginosa*.

4- La CFTR actúa como receptor para el LPS, de tal forma que su alteración determina una eliminación de *P. aeruginosa* por las células epiteliales entre 10 y 50 veces menor en los pacientes con FQ, favoreciendo su persistencia en las vías respiratorias.

5- La concentración de hierro está aumentada en las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ, lo cual parece favorecer la persistencia de la colonización por *P.aeruginosa*.

6- La alteración de la CFTR en los macrófagos alveolares reduce la acidificación de los fagolisosomas, limitando su capacidad bactericida y por tanto promoviendo la persistencia de la infección.

7- Las células del epitelio respiratorio de los pacientes FQ son incapaces de secretar tiocianato, disminuyendo drásticamente su capacidad bactericida a través de la formación de moléculas de oxígeno reactivo.

Todo ello explicaría la mayor adherencia de *P.aeruginosa* a las células epiteliales de los pacientes con FQ y su capacidad de persistencia en las vías respiratorias de estos pacientes.

1.1.7. Tratamiento en la Fibrosis Quística

Va dirigido a combatir las complicaciones de la enfermedad y a mejorar la calidad de vida, ya que no hay un tratamiento curativo definitivo. El tratamiento de la desnutrición y de las infecciones respiratorias es la base del tratamiento de la FQ.

La utilización de enzimas pancreáticas en los pacientes con insuficiencia pancreática, y una nutrición adecuada mediante una dieta hipercalórica, paliaran la desnutrición que padecen estos enfermos, consecuencia principalmente de una mala absorción de las grasas que lleva asociada una pérdida de otros nutrientes, vitaminas liposolubles, etc.

Respecto a las complicaciones del aparato respiratorio, la finalidad del tratamiento es fluidificar y eliminar las secreciones y prevenir y tratar las infecciones. Se utiliza la fisioterapia respiratoria y el drenaje postural para la eliminación mecánica de las secreciones purulentas del tracto respiratorio inferior. Otras terapéuticas adyuvantes son los broncodilatadores, mucolíticos, DNAsa y las soluciones salinas hipertónicas.

La utilización de la terapia antiinflamatoria tiene la finalidad de disminuir la respuesta inflamatoria incontrolada frente a las infecciones como principal causante de la lesión pulmonar progresiva. Los valores normales de IgG se asocian con mejores parámetros clínicos y una más lenta progresión de la enfermedad. La utilización de corticoides ha mostrado su eficacia en enlentecer la progresión de la enfermedad, pero sus importantes efectos secundarios limitan su utilización. Otros antiinflamatorios no esteroideos, como el ibuprofeno a dosis altas, también enlentecen la progresión con menos efectos secundarios.

En el tratamiento de las infecciones respiratorias, la elección de los antibióticos se determinará según el tipo de microorganismo y su sensibilidad, y la vía de administración de los fármacos, intravenosa, oral o inhalada, se decidirá en función de la gravedad de la

exacerbación respiratoria. El tratamiento intravenoso es el más efectivo en las exacerbaciones respiratorias moderadas y severas. Habitualmente se emplean dos antibióticos, debido a que la combinación de dos fármacos antimicrobianos disminuye el riesgo de aparición de resistencias, a dosis altas durante 14-21 días, siendo los regímenes más comunes los que asocian un aminoglucósido con un β -lactámico activo frente a *P.aeruginosa*. La pauta antibiótica más habitual es amikacina más una cefalosporina de tercera generación como la ceftazidima. Los antibióticos intravenosos también se han administrado, sin que exista una exacerbación, para intentar frenar el deterioro clínico y de la función respiratoria cuando no han resultado eficaces otras terapias. El ciprofloxacino suele reservarse para la administración oral, debido a la escasez de fármacos antipseudomonas disponibles por esta vía y al elevado índice de resistencias que ocasiona su utilización continuada. En los enfermos que precisan con mucha frecuencia ciclos antibióticos intravenosos se suelen colocar vías centrales, que ofrecen comodidad con riesgo mínimo de complicaciones.

Si *S.aureus* o *H.influenzae* colonizan las vías respiratorias además de *P.aeruginosa*, deben añadirse fármacos que cubran estas bacterias o bien cambiar alguno de los iniciales por otro que sea activo frente a ellas. El tratamiento oral e inhalado se utiliza en las exacerbaciones leves o moderadas. Entre los pocos fármacos disponibles por vía oral frente a *P.aeruginosa*, los más empleados son las quinolonas (ciprofloxacino y ofloxacino) y menos frecuentemente el sulfametoxazol-trimetoprim y el cloramfenicol. El principal problema que presenta el ciprofloxacino es la rápida generación de resistencias a las 3 o 4 semanas de tratamiento, aunque suelen recuperar las sensibilidades a las semanas o meses de la suspensión del mismo. Los antibióticos nebulizados permiten depositar altas concentraciones del fármaco en el sitio de infección, con baja absorción sistémica, sin que apenas se generen resistencias y con mínimos efectos secundarios. Los antibióticos más utilizados son la colistina y entre los aminoglucósidos la tobramicina. La indicación principal de los antibióticos inhalados es la terapia de mantenimiento. En el tratamiento anti estafilocócico, los centros daneses siguen recomendando la terapia discontinua cada 3-4 meses con antibiótico endovenoso para los portadores crónicos, argumentando la mejor evolución y pronóstico de estos pacientes, aparentemente sin la selección de gérmenes resistentes que

otros argumentaban. La utilización en su defecto de terapias continuas o discontinuas de tratamiento antibiótico nebulizado puede ser una alternativa.

También se ha evaluado la utilización de vacunas para prevenir la colonización inicial, principalmente frente a *P.aeruginosa*, aunque los resultados han sido frecuentemente desalentadores. En un estudio, en el que se ha valorado la eficacia de una vacuna conjugada polivalente frente a *P.aeruginosa*²¹, se observó que la vacunación regular durante un periodo de 10 años reduce significativamente la frecuencia de infección crónica en los pacientes vacunados (32%) respecto al grupo control (72%).

Otras opciones como la terapia intracelular y la terapia génica están aún en fase de investigación. El trasplante pulmonar es la última opción terapéutica en los pacientes con enfermedad pulmonar crónica que es incompatible con la supervivencia a pesar de haber recibido un tratamiento médico intensivo.

1.1.8. Estrategias de tratamiento de las infecciones por *P.aeruginosa*

Durante la vida de un paciente con FQ, la prescripción de antibióticos para tratar las infecciones por *P. aeruginosa* responde normalmente a tres situaciones clínicas. La primera, durante la infección inicial para evitar la instauración de la infección crónica. La segunda, cuando el paciente está colonizado crónicamente, para minimizar el deterioro de la función pulmonar y reducir la frecuencia y morbilidad de las exacerbaciones pulmonares. La tercera, durante las exacerbaciones de los síntomas pulmonares, para eliminar o disminuir la sintomatología y restaurar la función pulmonar.

Aunque no hay un consenso absoluto sobre el uso de antibióticos para erradicar la infección inicial por *P.aeruginosa*, la mayoría de autores defienden su conveniencia ya que la erradicación de la bacteria tiene éxito en el 80-90% de los casos²²⁻²⁵ a pesar de que la eficacia de los antibióticos puede ser limitada en ocasiones debido al rápido desarrollo de resistencias por parte de *P. aeruginosa*²⁶.

Los antibióticos que tienen actividad contra *P.aeruginosa* incluyen:

1. Aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, tobramicina)
2. Quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino)
3. Cefalosporinas (ceftazidime, cefepime, cefoperazone, cefpirome, pero no cefuroxime, ceftriaxone ni cefotaxime)
4. Penicilinas antipseudomonas: ureidopenicilinas y carboxipenicilinas (piperacilina, ticarcilina) *P.aeruginosa* es intrínsecamente resistente a todas las demás penicilinas.
5. Carbapenemas (meropenem, imipenem, doripenem, pero no ertapenem)
6. Polimixinas (polimixina B y colistina)
7. Monobactámicos (aztreonam)

Un comentario aparte merece el uso de la azitromicina durante periodos continuados de 3 a 6 meses. Diversos estudios han demostrado que el uso de este macrólido se asocia a menor número de exacerbaciones, aumento de peso y mejoría de la función pulmonar en pacientes con FQ infectados por *P.aeruginosa*²⁷. Los mecanismos de acción que explicarían estos efectos beneficiosos no están completamente estudiados pero serían de tipo indirecto e incluirían la inhibición de la comunicación bacteriana (quorum sensing), la inhibición de la formación de biofilm y la disminución en la síntesis de toxinas y factores de virulencia con el consiguiente efecto antiinflamatorio. Aunque en principio la azitromicina no es capaz de inhibir el crecimiento de *P.aeruginosa* a las concentraciones que se pueden alcanzar in vivo, recientemente se ha publicado un trabajo²⁸ que muestra que las CMI de la azitromicina in vitro pueden disminuir desde ≥ 128 mg/L hasta 1-16 mg/L cuando se ensayan en un medio suplementado con suero o lavado broncoalveolar lo que podría explicar la efectividad clínica de este fármaco frente a *P.aeruginosa*.

Colonización inicial. Se ha evaluado el uso de antibióticos nebulizados o en combinación con antibióticos orales o intravenosos aunque no está claramente establecido el tratamiento óptimo, las dosis o las mejores combinaciones. Mayoritariamente, ante el primer aislamiento de *P.aeruginosa* en el esputo, se inicia un régimen combinado de 3-4 semanas de colistina nebulizada y ciprofloxacino oral. También se utilizan colistina o tobramicina inhaladas solas. Si el cultivo se negativiza, hay grupos que suspenden el tratamiento, otros lo mantienen desde 3 hasta 12 meses, para aumentar el tiempo hasta la recurrencia, y otros sólo

mantiene la colistina. Si no desaparece *P.aeruginosa* o aparecen nuevos síntomas se mantiene la colistina 3 meses y se inicia un ciclo de 2 semanas de tratamiento endovenoso con ceftacídime y tobramicina.

Colonización-infección intermitente. Nuevos cultivos de esputo positivos para PA se tratarán de la misma forma, manteniendo la colistina y el ciprofloxacino durante 3 meses. Independientemente de los criterios usados, se aconseja el inicio de tratamiento endovenoso, que debe ser continuado durante un mínimo de 10-14 días y un máximo 21 días o hasta que se observe mejoría. Por lo general, se utiliza la combinación de 2 antibióticos con diferente mecanismo de acción, como un β -lactámico y un aminoglucósido.

Colonización-infección crónica. Delante de esta situación, dos aproximaciones son posibles con resultados publicados en ocasiones controvertidos. Los centros daneses, como consecuencia de sus excelentes resultados de supervivencia y morbilidad, aplican el tratamiento electivo endovenoso a meses alternos; mientras que, otros centros sólo lo realizan cada 3-4 meses o únicamente tratamiento sintomático. La tendencia en conjunto es a tratar con tratamiento inhalado continuo o intermitente y a realizar tratamiento sintomático de las exacerbaciones, siendo frecuente en los casos clínicos moderados-severos la realización de 3-4 ciclos de tratamiento endovenoso al año. Argumentos para la administración electiva de antibióticos endovenosos serían la disminución del número de exacerbaciones, la reducción de la infección y de los posibles efectos inflamatorios de la misma, el mejorar la función pulmonar, el peso y la supervivencia. A favor de tratar sólo las exacerbaciones, estaría la falta de evidencia del beneficio de los antibióticos electivos, la presumible presencia de menos problemas médicos (alergia, resistencia, accesos venosos, toxicidad), menor disrupción personal y familiar, menor coste y desconocimiento de los efectos adversos de los antibióticos a largo plazo. La progresión de la enfermedad en pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa* es individual y numerosos factores, probablemente aún desconocidos, pueden jugar un papel importante. De manera que, es muy importante individualizar el manejo y éste puede incluir el tratamiento endovenoso electivo profiláctico cada 3 meses en algunos pacientes^{24, 29, 30}.

1.1.9. Pronóstico

En los últimos cincuenta años, la expectativa de vida de los enfermos ha pasado de ser inferior a un año a casi cuarenta años en el 2010 gracias al diagnóstico precoz, a las mejoras en la nutrición y al avance en el tratamiento de las enfermedades respiratorias, aunque la causa más frecuente de muerte sigue siendo sobre todo la reiteración de las enfermedades pulmonares infecciosas que llevan a un deterioro progresivo de la función pulmonar.

Un peor pronóstico se relaciona con la mutación del codón F508del, especialmente en enfermos homocigotos, ya que la aparición de la sintomatología es más precoz y se produce una mayor alteración de las funciones pancreática y respiratoria.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* y Fibrosis Quística

1.2.1. Características generales de *P.aeruginosa*

Es un bacilo Gram negativo perteneciente a la Familia Pseudomonadaceae, aerobio, no esporulado ni capsulado, móvil con uno o más flagelos polares, catalasa y oxidasa positivas. Crece en agar McConkey, donde aparece como lactosa negativo, y en agar inclinado de Kligler donde se muestra como no fermentador. Quimiorganotrofo, con un metabolismo estrictamente aerobio con el oxígeno como aceptor final de electrones. Puede utilizar una gran variedad de carbohidratos como fuente de carbono y energía. Degrada el nitrato a nitrito o gas nitrógeno.

Las colonias pueden ser de diferentes tamaños y presentar distintas morfologías, lisa, rugosa, metálica o mucoide/mucoso. El fenotipo mucoso se debe a la hiperproducción constitutiva por *P.aeruginosa* de un exopolisacárido mucoide denominado también alginato por su similitud química con un polisacárido producido por algunas algas marinas. Está compuesto por estructuras lineales muy organizadas que sobresalen de la superficie bacteriana y facilitan la unión al epitelio respiratorio. Se asocia con infección pulmonar crónica en individuos con FQ pero es raro en otras poblaciones de pacientes. Las microcolonias quedan embebidas en esta capa y protegidas del ataque de las defensas del huésped. Las colonias no mucosas de *P.aeruginosa* utilizan las fimbrias para adherirse al epitelio oro-faríngeo.

La producción de piocianina es exclusiva de *P.aeruginosa*. Es un pigmento verde-azulado hidrosoluble no fluorescente que le da un color verdoso al medio de cultivo. Unas pocas cepas pueden producir otros pigmentos, como piorrubina de color rojo, piomelanina de color marrón-negruzco o pioverdina de color amarillo-verdoso y fluorescente. La piocianina puede tener un papel en la patogénesis de la FQ por su capacidad para inhibir el movimiento de los cilios. De esta forma la alteración del primer mecanismo de defensa del huésped, favorecería la colonización inicial y la persistencia en el árbol respiratorio. Además la

actividad bactericida de la piocianina sobre bacterias Gram positivas y negativas puede eliminar la flora normal del huésped y facilitar la colonización por *P.aeruginosa*.

La mayoría de las colonias de *P.aeruginosa* pueden identificarse gracias a unas pocas características: colonias grandes con un olor dulzón por la síntesis de 2-aminocetofenona, producción de piocianina, oxidasa positiva y crecimiento a 42° C. Se encuentra de forma habitual en el medio ambiente tanto en el agua, suelo como en las plantas. Gracias a su gran capacidad de adaptación a ambientes desfavorables, especialmente ambientes húmedos y a su resistencia a gran número de antibióticos y desinfectantes es particularmente problemática en el ambiente hospitalario.

P.aeruginosa es el miembro de la familia mejor estudiado como patógeno nosocomial ya que puede pervivir en gran variedad de soluciones acuosas como desinfectantes, jabones, líquidos de diálisis, ungüentos, líquidos de irrigación o equipos de diálisis, respiradores o humidificadores. El espectro de enfermedades causadas por este microorganismo es muy amplio. Va desde infecciones cutáneas superficiales a sepsis fulminantes. *P.aeruginosa* es una de las principales causas de infección nosocomial del tracto respiratorio y urinario, aunque también causa bacteriemia.

La adquisición nosocomial de *P.aeruginosa* es frecuente, la mayoría en pacientes inmunodeprimidos o con alteraciones de las barreras normales de piel y mucosas por quemaduras, cirugía, cateterismos, intubación o heridas traumáticas a través de agua o soluciones contaminadas.

Cuando se compara con patógenos bacterianos bien establecidos, *P. aeruginosa* se tiene que considerar un patógeno oportunista ya que en ausencia de debilidad del huésped es virtualmente no virulento. Sin embargo, *P. aeruginosa* posee una amplia variedad de factores de virulencia potenciales que contribuyen a su patogenicidad. En la Tabla-1.2.1 se enumeran los más importantes y se describe su función

Tabla-1.2.1. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* relevantes para la infección en la FQ

Factor	Función
Alginato (exopolisacárido mucoide)	Adherencia al epitelio respiratorio Barrera frente a la penetración de fagocitos, antibiótico, etc.
Fimbrias	Adherencia al epitelio orofaríngeo
Proteasas (Elastasa y proteasa alcalina)	Necrosis local, degradación de IgG
Exotoxina A	Toxicidad sistémica Papel en la FQ oscuro
Piocianina	Inhibe la función ciliar

Las fimbrias de la bacteria tienen capacidad para unirse a las células epiteliales y la bacteria produce además gran variedad de exoproteínas con capacidad enzimática que son liberadas al medio extracelular. Las principales son proteasas como la proteasa alcalina y la elastasa, que dañan el tejido pulmonar, y la exotoxina A que inhibe la síntesis de proteínas. Todas las cepas de *P.aeruginosa* producen una fosfolipasa termolábil (C), responsable de su actividad hemolítica. También producen otras hemolisinas, endotoxinas y leucocidinas.

La bacteria una vez adherida al epitelio respiratorio puede recubrirse ella misma de la matriz de alginato que la protegerá de las defensas del huésped y elaborar localmente varios productos extra celulares que contribuirán a la necrosis de tejido pulmonar.

1.2.2. Principales componentes de *P.aeruginosa* con capacidad antigénica

La pared celular es una estructura semirrígida situada en el exterior de la membrana citoplasmática. Es responsable de la forma celular y de proteger a la célula de las diferencias de presión. También es el punto de actuación de diversos antimicrobianos y de bacteriófagos. Está compuesta por tres capas: una membrana externa bilaminar (lipopolisacárido y fosfolípidos), una capa de mureína y una capa más interna de composición fosfolipídica. Muchos de sus componentes son antigénicos, lo que los convierte en herramientas muy útiles para la detección de la respuesta inmune específica frente a *P.aeruginosa*. El **Lipopolisacárido (LPS)** es una macromolécula de la superficie celular con un amplio rango de actividades biológicas. Activa el complemento, activa las citoquinas y es responsable de

muchos síntomas y características fisiopatológicas de las infecciones por bacilos Gram negativos³¹. Sus componentes más importantes son el antígeno O (cadenas de carbohidratos largas), el core (oligosacáridos) y el lípido A (glucolípido). El antígeno O es antigénico y tiene un importante papel en la virulencia de *P.aeruginosa*, impide la entrada de compuestos lesivos para la célula, como los antibióticos. El lípido A presenta importantes características patogénicas. Pacientes crónicos con infección respiratoria tienen elevadas cantidades de LPS localizadas en los pulmones, pero no suelen verse síntomas de endotoxemia (28). En diversos estudios se ha comprobado que se produce una respuesta del sistema inmunológico a un gran número de antígenos del LPS en pacientes con fibrosis quística colonizados por *P.aeruginosa*³². En general los anticuerpos tipo IgG actúan frente al antígeno O, opsonizando a la bacteria para su destrucción por fagocitosis, mientras que los anticuerpos tipo IgM actuarían frente al core-lípido A, sirviendo de protección contra síntomas endotóxicos³³.

Las proteínas de membrana externa (PME) de *P.aeruginosa* están altamente conservadas en los diferentes serotipos de *P.aeruginosa*³⁴⁻³⁶. Esta característica y el hecho de no presentar reacción cruzada con las proteínas de membrana externa de otros bacilos Gram negativos como las enterobacterias, su comprobada antigenicidad en pacientes con FQ^{35,37} y que no se detectan anticuerpos de forma significativa en personas sanas las hace muy útiles en el estudio de anticuerpos frente a *P.aeruginosa*. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos frente a una gran variedad de PME en sueros de pacientes con FQ. La presencia de anticuerpos sería un indicador de enfermedad respiratoria crónica en pacientes con FQ, de forma que la intensidad de la respuesta inmunitaria estaría relacionada con la duración de la colonización por *P.aeruginosa*³⁵.

P.aeruginosa excreta varias **proteínas enzimáticas extracelulares** que pueden actuar como factores de virulencia y que presentan a su vez capacidad antigénica. Se han identificado al menos tres **proteasas** en *P.aeruginosa*, y dos de ellas, **elastasa y proteasa alcalina** se han asociado con virulencia³⁸. La actividad de la **elastasa** en combinación con la proteasa alcalina produce necrosis tisular. Las cepas mucoides de *P.aeruginosa* aisladas en pacientes con FQ son menos proteolíticas que las no mucoides aisladas en la misma muestra³⁹. Se ha propuesto que la actividad proteolítica de las cepas no mucoides, más frecuentes en las

etapas tempranas de la colonización, facilitaría el establecimiento de las cepas mucoides. Además la elastasa puede interferir las defensas del huésped degradando las IgG en subunidades menos activas. La mayoría de pacientes con FQ colonizados crónicamente por *P.aeruginosa* tienen elevados niveles de anticuerpos anti-proteasas en el suero pero se desconoce si estos anticuerpos son capaces de neutralizar las proteasas bacterianas acumuladas en el pulmón. Todas las cepas de *P.aeruginosa* producen una fosfolipasa termolábil, la **fosfolipasa C**, que junto con un glicolípido es la responsable de su actividad hemolítica. Las cepas no mucoides la expresan en mayor cantidad que las mucoides pero no parece existir correlación entre la producción de fosfolipasa C y la severidad de la infección respiratoria. La **exotoxina A** es un proenzima que detiene la síntesis proteica en las células de los mamíferos. Su citotoxicidad se manifiesta por algunos signos patológicos como necrosis celular difusa del hígado, leucopenia, hemorragia pulmonar o necrosis adrenal. La exotoxina A es inmunogénica y se ha asociado con la producción de infecciones sistémicas por *P.aeruginosa* aunque su papel en la patogenia de la FQ no está claro. Se puede demostrar producción de anticuerpos en el suero de los pacientes con FQ pero no parece producir protección frente a la infección por *P.aeruginosa*. La exotoxina A es también tóxica para los macrófagos humanos por lo que contribuye a la supervivencia de *P.aeruginosa* en el pulmón.

1.2.3. Proceso de colonización respiratoria por *P.aeruginosa* en los pacientes con FQ

Aunque generalmente la colonización se adquiere a partir de microorganismos presentes en el ambiente, la transmisión cruzada entre pacientes no es infrecuente, particularmente entre miembros de una misma familia. Asimismo, se han descrito brotes epidémicos de colonización-infección por *P.aeruginosa* en varios centros de atención a pacientes con FQ.

Inicialmente, la colonización del tracto respiratorio se produce por morfotipos no mucosos, generalmente sensibles a los antimicrobianos, y se presenta con una baja densidad bacteriana. Durante un período de tiempo más o menos prolongado, el aislamiento de *P.aeruginosa* puede ser intermitente. La posterior colonización-infección pulmonar crónica por *P.aeruginosa* es consecuencia tanto de factores intrínsecos a la propia patología, discutidos en el apartado anterior, como de la adaptación de *P.aeruginosa* al nuevo entorno.

Una vez *P.aeruginosa* se establece crónicamente es prácticamente imposible conseguir su erradicación.

En el proceso de adaptación tienen lugar cambios tanto metabólicos como moleculares en la población bacteriana que permiten la persistencia de *P.aeruginosa* en las vías respiratorias de los pacientes con FQ. Entre los cambios metabólicos hay que destacar la transición desde el crecimiento de *P.aeruginosa* en forma libre suspendida en medio acuoso, al de crecimiento formando las denominadas biopelículas o *biofilms*. El crecimiento en forma de biopelículas confiere al microorganismo una notable resistencia tanto a los tratamientos antibióticos como a la propia respuesta inmunitaria del paciente, favoreciendo su persistencia en las vías respiratorias.

Al desarrollo de la infección crónica por *P. aeruginosa* contribuye también un proceso de adaptación genética que le permitirá resistir las condiciones ambientales adversas, incluyendo la respuesta inmunitaria y los tratamientos antibióticos. Gracias a ella emergen gran cantidad de variantes fenotípicas características de la infección crónica, principalmente el morfotipo mucóide y las variantes de lento crecimiento o colonias enanas. Otras variantes fenotípicas son los mutantes aflagelados o con modificaciones del LPS. Particularmente, se ha comprobado que la conversión al morfotipo mucóide se correlaciona con un aumento en la producción de anticuerpos específicos y se asocia con el avance de la enfermedad, la disminución de la eficacia de los antibióticos y una mayor mortalidad ⁴⁰. Asimismo, el incremento en el número de variantes morfológicas se ha correlacionado con el progresivo deterioro de la función pulmonar.

Estas características propician el desarrollo y selección de cepas multirresistentes con alto nivel de resistencia a múltiples antibióticos, como consecuencia de su uso prolongado. *P.aeruginosa* tiene una extraordinaria capacidad de desarrollar resistencia mediante mutaciones cromosómicas a prácticamente todos los antibióticos utilizados, incluyendo β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas.

1.2.4. Significado clínico de la colonización respiratoria por *P.aeruginosa* en la FQ

A partir de la segunda mitad del siglo XX, como consecuencia de la mayor esperanza de vida de los pacientes con FQ, empieza a cobrar relevancia la infección broncopulmonar crónica por *P.aeruginosa*.

Como ya se ha dicho ya anteriormente, *P.aeruginosa* es con diferencia el microorganismo que más frecuentemente coloniza las vías aéreas de los pacientes FQ y se sitúa como la principal causa de la todavía elevada morbi-mortalidad asociada a la FQ. Aproximadamente el 60% de los pacientes está crónicamente colonizado por este microorganismo⁴⁰. La prevalencia de colonización-infección por *P. aeruginosa* aumenta con la edad, llegando al 80% en pacientes mayores de 18 años. La colonización-infección por *P.aeruginosa* se relaciona claramente con un mayor deterioro de la función pulmonar, una disminución de la supervivencia y se ha comprobado que su adquisición en edades tempranas influye negativamente en el pronóstico de la enfermedad.

Casi una tercera parte de los pacientes con FQ se colonizan por *P. aeruginosa* durante los primeros años de vida. En una cohorte de pacientes seguidos desde el nacimiento se estudió el tiempo de adquisición de *P.aeruginosa* no mucóide y *P.aeruginosa* mucóide⁴¹, la media de edad de adquisición de *P. aeruginosa* fue de 1 año y el 29% durante los 6 primeros meses de vida. Sin embargo, la edad media de adquisición de *P.aeruginosa* mucóide se retrasó hasta los 13 años, si bien la presencia del fenotipo mucoso se incrementó notablemente entre los 4 y los 16 años. En contraste con la rápida adquisición de *P.aeruginosa* no mucóide la transición al fenotipo mucóide fue relativamente prolongado con una media de 10,9 años y puede alargarse más con tratamiento antibiótico adecuado.

En esta misma cohorte, se realizó la determinación de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* junto con la recogida de parámetros clínicos, pruebas funcionales y radiológicas respiratorias. Los anticuerpos anti-*P.aeruginosa* son detectables durante la adquisición de *P.aeruginosa* no mucóide y aumentan durante la transición al fenotipo mucoso mientras que el deterioro en los síntomas clínicos y las pruebas funcionales y radiológicas se correlacionan principalmente con la adquisición del fenotipo mucoso⁴¹. Así pues la detección de anticuerpos anti-

P.aeruginosa sería un marcador precoz de la colonización por este microorganismo mientras que la aparición del fenotipo mucóide sería un marcador tardío, coetáneo del deterioro pulmonar.

La colonización-infección temprana por *P.aeruginosa* también es un factor de mal pronóstico. Se ha visto que los pacientes colonizados por *P.aeruginosa* durante los primeros 5 años de vida tienen un riesgo mayor de mortalidad (2.6 veces) que la que presentan los pacientes con FQ no colonizados^{40,42} También se observan unos valores significativamente más bajos de volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1), menor percentil de peso y aumento del número de hospitalizaciones. Los factores de riesgo para la colonización-infección temprana por *P.aeruginosa* incluyen la infección previa por *S.aureus*, pertenecer al sexo femenino, presencia homocigótica de la mutación F508del y el contacto previo con pacientes adultos con FQ. La colonización-infección temprana por *P.aeruginosa* debe pues detectarse cuanto antes para evitar la instauración de la colonización crónica.

En la colonización crónica, la cada vez más elevada producción de anticuerpos específicos frente a *P.aeruginosa* favorece la obstrucción e inflamación broncopulmonar formando inmunocomplejos^{43,44}. Éstos, junto con la elevada carga bacteriana en el pulmón, contribuyen al propio proceso patológico al activar los mediadores de la inflamación. La respuesta inflamatoria que se genera es muy intensa y se perpetúa al ser incapaz de eliminar al microorganismo. Como ya hemos visto, ocasiona la destrucción del parénquima pulmonar y el deterioro progresivo de la función pulmonar⁴⁵⁻⁴⁷ Curiosamente por el contrario, la bacteriemia es infrecuente en los pacientes con FQ con infección crónica por *P.aeruginosa* debido probablemente al elevado nivel de anticuerpos circulantes frente a varios antígenos y factores de virulencia⁴³.

1.2.5. Diagnóstico y seguimiento microbiológico de la colonización por *P. aeruginosa*

El diagnóstico y seguimiento microbiológico de la colonización por *P. aeruginosa* es sin duda una herramienta clave para el manejo clínico de los pacientes con FQ. La detección precoz de la colonización por este microorganismo es de extraordinaria relevancia, ya que la erradicación únicamente será posible durante los primeros estadios del proceso. Es importante detectar cuanto antes la colonización inicial ya que el tratamiento antibiótico precoz puede evitar o retrasar la infección crónica, que como ya se ha dicho, una vez establecida muy raramente puede erradicarse^{22, 48, 49}. Asimismo, una vez establecida la colonización crónica, el seguimiento microbiológico es sin duda de gran utilidad para la valoración clínica de la evolución del cuadro patológico, particularmente en lo que se refiere a la eficacia de los continuos tratamientos antimicrobianos, destinados a mantener una carga bacteriana lo más baja posible y espaciar las exacerbaciones con el fin de minimizar el deterioro broncopulmonar progresivo.

El cultivo de muestras respiratorias es la técnica utilizada habitualmente para la detección de *P.aeruginosa*. Los resultados del seguimiento microbiológico seriado permiten conocer el patrón de colonización y definir el estadio de colonización pulmonar en el que se encuentra el paciente. Sin embargo, no existe consenso internacional sobre la definición más apropiada para colonización intermitente y colonización crónica basada en los resultados del cultivo de muestras respiratorias y por lo tanto no hay una única clasificación del estadio de colonización por *P aeruginosa*. En la Tabla-1.2.5.1 se recogen las definiciones realizadas por el Grupo Español de Consenso del Tratamiento Antimicrobiano en el Paciente con Fibrosis Quística⁵⁰ similares a los criterios europeos²⁴ y los criterios basados en Lee et al⁵¹. El objetivo de estos criterios es la clasificación de los pacientes para establecer las pautas de tratamiento antimicrobiano más adecuadas al estadio de colonización por *P.aeruginosa* en el que se encuentra el paciente. El cultivo se utiliza a menudo como la técnica de referencia para comparar otras técnicas, serológicas o moleculares, y por tanto la valoración de éstas está influenciada por los resultados del cultivo.

Tabla -1.2.5.1. Estadios de colonización pulmonar por *P. aeruginosa* en el paciente con FQ

Estadio de infección-colonización	Criterios Español y Europeo (1)	Criterios Lee et al (2)
Nunca colonizado	Todos los cultivos negativos para <i>P.aeruginosa</i>	Nunca se ha aislado <i>P.aeruginosa</i>
No colonización		Todos los cultivos negativos para <i>P.aeruginosa</i> en los 12 meses previos, teniendo cultivos anteriores positivos
Colonización inicial	Primer cultivo positivo para <i>P.aeruginosa</i> . Un nuevo cultivo positivo después de más de 1 año de cultivos negativos se considera un nuevo episodio de colonización inicial	≤50% de todos los cultivos positivos para <i>P.aeruginosa</i> con al menos un cultivo positivo en los 12 meses previos
Colonización Intermitente	Detección, en un período de 6 meses a partir de la colonización inicial, de un cultivo positivo para <i>P.aeruginosa</i> de entre un mínimo de 3 cultivos separados al menos un mes entre ellos	
Colonización Crónica	Cultivos positivos persistentes de <i>P. aeruginosa</i> : detección, en un período de 6 meses, de al menos 3 cultivos positivos para <i>P. aeruginosa</i> en muestras separadas entre sí al menos por un mes	>50% de todos los cultivos positivos para <i>P.aeruginosa</i> en los 12 meses precedentes

1- Maíz L, Baranda F, Coll R, Prados C, Vendrell M, Escribano A, Gartner S, de Gracia S, Martínez M, Salcedo A, Vázquez C. 2001. Normativa del diagnóstico y el tratamiento de la afección respiratoria en la fibrosis quística. Arch Bronconeumol 37: 316-324).

Döring G, Conway SP, Heijerman HGM, Hodson ME, Høiby N, Smyth A, Touw DJ, for the consensus Group: Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. Eur Respir J 2000, 16:749-767

2- Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, et al. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 2003; 2: 29–3)

La colonización intermitente se caracteriza por cultivos positivos y negativos y suele ser de bajo grado por lo que *P. aeruginosa* puede no detectarse en el cultivo. En la colonización intermitente pueden coexistir diferentes morfotipos coloniales incluyendo cepas mucosas. Los aislados suelen conservar su sensibilidad a los antimicrobianos de elección.

En la colonización crónica los cultivos son casi siempre positivos para *P. aeruginosa* y la colonización del pulmón es prácticamente permanente. Se habla de colonización cuando no hay signos directos (inflamación, fiebre, etc.) o indirectos (respuesta al tratamiento antibiótico específico) de infección y daño tisular. La colonización-infección también puede ser diagnosticada sobre la base de una respuesta positiva de anticuerpos en al menos 2 muestras en pacientes que no expectoren y presenten cultivos bacterianos negativos. Las exacerbaciones agudas en el curso de la colonización crónica se caracterizan por la aparición de signos clínicos de infección, incremento del título de anticuerpos y suelen coincidir con aumentos de la masa bacteriana total o variaciones antigénicas. El punto en el cual la colonización se transforma en infección crónica no es fácil de establecer puesto que el aislamiento persistente de *P.aeruginosa* o del fenotipo mucóide en el cultivo de esputo es un marcador tardío en la mayoría de los casos.

La frecuencia con la que se debe realizar el estudio microbiológico es objeto de controversia. La aplicación de los criterios de colonización por *P aeruginosa* se facilita cuando se obtiene al menos una muestra para cultivo cada tres meses, incluidos los pacientes que tengan colonización previa. En los pacientes en los que se haya realizado un diagnóstico temprano de la FQ es necesario realizar un seguimiento bacteriológico continuo para detectar la primera colonización por *P. aeruginosa*. Estos cultivos deben ser como mínimo trimestrales. Cuando se produce la infección inicial, tras instaurar un tratamiento erradicador se deben realizar cultivos mensuales para monitorizar la eficacia del tratamiento antimicrobiano y constatar la posible erradicación bacteriana. Un solo cultivo negativo no indica erradicación ya que en ocasiones se reduce la carga bacteriana hasta niveles indetectables para el cultivo pero podría detectarse con técnicas de microbiología molecular. En los pacientes con colonización-infección crónica por *P.aeruginosa*, sería suficiente un cultivo trimestral salvo en las exacerbaciones o cuando requiera ingreso hospitalario ⁵².

En cuanto al tipo de muestra, el cultivo del esputo expectorado es un indicador muy adecuado de la microbiología de aparato respiratorio inferior, es la muestra de elección en el control de la infección respiratoria en el paciente con FQ y se considera la muestra que mejor refleja el patrón de colonización del tracto respiratorio del paciente con FQ. Para algunos

autores es incluso mejor que los lavados, los aspirados o cepillados broncoalveolares ya que tendría mejor representatividad de las diferentes localizaciones de la colonización pulmonar. Sin embargo, no siempre es posible obtenerlo sobre todo en niños muy pequeños y en paciente asintomáticos que no pueden expectorar. Como alternativa existen dos opciones bien estudiadas, el cultivo de exudados faríngeos (EF) o de lavados broncoalveolares (LBA).

El cultivo del EF es el más usado en niños pequeños con FQ para el seguimiento microbiológico ya que la flora orofaríngea se presupone representativa de los microorganismos presentes en el bronquio. Los datos de algunos estudios que valoran la capacidad del EF para predecir la colonización–infección respiratoria del tracto respiratorio inferior se muestran en la Tabla-1.2.5.2. Los estudios muestran una sensibilidad variable y en general baja para el aislamiento de *P.aeruginosa*, mientras que la especificidad es buena en todos ellos. El rendimiento del EF es inferior respecto tanto al esputo como al LBA.

Tabla.1.2.5.2. Estudios para valorar la capacidad del frotis faríngeo para predecir la colonización respiratoria del tracto respiratorio inferior

Publicación ¹	Pacientes	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Ramsey et al, 1991⁵⁵ FF/LBA	43 17 no exp 26 exp	46%	93%	83%	70%
Armstrong et al, 1996⁵³ FF/LBA	75	82%	83%	41%	97%
Rosenfeld et al, 1999⁵⁶ FF/LBA	141 <5 años	44%	95%	44%	95%
Burns et al, 2001⁵⁷ FF/LBA	40	-	-	69%	85%
Equi et al, 2001⁵⁸ FF/ESP	30	34%	100%	100%	21%
Jung et al, 2002⁵⁴ FF/LBA ESP/LBA	38	35,7-40% 91,7%	96,2-100% 100%	83,3-100% 100%	73,5-45,5% 94,1%
Kabra et al, 2004⁵⁹ FF/ESP FF+fisioterapia/ESP	48	40% 82%	99% 99%	- -	- -

¹FF (frotis faríngeo, LBA (lavado broncoalveolar), ESP (esputo), FF+fisioterapia (frotis faríngeo obtenido tras fisioterapia respiratoria)

Algunos de los trabajos concluyen que el cultivo de EF no predice con suficiente seguridad la presencia de *P.aeruginosa* en el tracto respiratorio inferior ⁵³⁻⁵⁵. En un estudio multicéntrico ⁵⁶ que incluye algunos de los pacientes analizados dos estudios anteriores ^{53, 55} sugieren que un cultivo de EF negativo es útil para descartar la infección pero que un resultado positivo no es suficiente para diagnosticar *P.aeruginosa* en el tracto inferior. En el mismo sentido, en un estudio longitudinal ⁵⁷ en el que se obtenía una muestra de LBA anual y muestras de EF cada tres meses, una de ellas coincidiendo con la broncoscopia, se observó que el cultivo del EF obtenido con el LBA tiene un valor predictivo negativo (VPN) mejor (85%) que su valor predictivo positivo (VPP) (69%) lo que apoyaría que los pacientes con cultivo de EF negativo es poco probable que lo tengan en el LBA, mientras que un EF positivo es menos exacto en predecir que *P.aeruginosa* también esté en el tracto respiratorio. Ambos valores predictivos mejoran (VPN 97% y VPP 83%) combinando los resultados de 2 cultivos de EF, el concurrente y el previo a la obtención del LBA.

Otros resultados contradicen los anteriores y concluyen que tanto en pacientes incapaces de expectorar como en pacientes asintomáticos, un resultado positivo en el frotis faríngeo es un fuerte predictor de un resultado positivo en el esputo mientras que un resultado negativo no permite descartar la infección de las vías respiratorias inferiores y se debería investigar por otros medios, por ejemplo con LBA ⁵⁸ o sugieren la utilidad de realizar fisioterapia respiratoria antes de realizar la toma del EF ⁵⁹. El cultivo de LBA tiene mejor sensibilidad en niños que no expectoran y se ha considerado la técnica de referencia ⁶⁰ pero su obtención por broncoscopia no es una técnica de rutina ya que es invasiva y requiere sedación o anestesia general, con el consiguiente aumento de riesgo y coste. Otro inconveniente del LBA es que se realiza en sólo un lóbulo lo que aumenta el riesgo de no detectar una infección localizada en una región no muestreada.

Otra alternativa en pacientes que no expectoran, es la obtención de esputo mediante la inducción de la expectoración con una solución salina hipertónica. Esta muestra es un buen reflejo de la colonización del tracto respiratorio inferior (61,62). Respecto al LBA, el esputo inducido tiene la ventaja de reflejar mejor la totalidad de la flora microbiana pero sólo es aplicable en niños mayores y adultos con FQ.

Por todas estas razones, las muestras más utilizadas son el esputo, por su facilidad de obtención y buena correlación con el LBA, y en los pacientes en los que no se pueden obtener muestras de esputo o en los niños pequeños, se utiliza habitualmente el cultivo del EF. Aunque no hay acuerdo en la frecuencia con la que se deben realizar estos controles, se recomienda repetirlos en cada visita y como mínimo mensual o trimestralmente. El LBA se reserva para pacientes que no responden a la terapia o que muestran una progresión de la enfermedad pulmonar.

A pesar de la demostrada utilidad del cultivo seriado, éste puede ser negativo en determinadas situaciones, especialmente en pacientes con tratamiento antimicrobiano, con baja carga bacteriana o cuando no se puede obtener muestras respiratorias de suficiente calidad. Por tanto, sería muy útil disponer de pruebas complementarias al cultivo que nos permitieran aumentar la sensibilidad en el diagnóstico precoz de la colonización por *P.aeruginosa*. La utilización de técnicas independientes de la presencia de bacterias viables en suficiente cantidad para ser detectadas mediante cultivo convencional, como la determinación de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* en suero o la detección del DNA de la bacteria en muestras respiratorias, podrían aportar información complementaria de gran utilidad⁶³ en la colonización inicial o intermitente de los pacientes con FQ.

1.2.6. Determinación de anticuerpos anti- *P. aeruginosa* en pacientes con FQ

El interés por la serología de *P.aeruginosa*, no sin renovada controversia, ha ido en aumento desde que se diagnostican precozmente un número creciente de pacientes cada vez más jóvenes, sobre todo a través del cribado neonatal. Afortunadamente, la mayoría de estos niños se encuentra libre de infección por *P.aeruginosa* en el momento del diagnóstico. Una de las prioridades del seguimiento y control clínico de estos pacientes es detectar precozmente la infección inicial por *P.aeruginosa* para conseguir erradicarla con un tratamiento antibiótico adecuado.

Los métodos tradicionales para detectar *P.aeruginosa* basados únicamente en el cultivo bacteriológico probablemente no tienen una sensibilidad suficiente en niños muy pequeños. En ellos no es posible obtener muestras respiratorias de buena calidad porque no

pueden expectorar, tampoco es conveniente antes de los 8 años inducir la expectoración y la obtención de muestras respiratorias por broncoscopia y LBA no se pueden obtener rutinaria ni frecuentemente. En estos pacientes por tanto, se ha reanudado el interés por el valor diagnóstico potencial de la determinación de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* en la detección precoz de la infección por este microorganismo ⁶⁴.

Técnicas utilizadas en la determinación de anticuerpos anti- *P. aeruginosa*. Los trabajos pioneros sobre serología de *P.aeruginosa* se publicaron hace dos a tres décadas cuando los equipos de Niels Hoiby y Gerd Doring desarrollaron la metodología inicial ^{65, 66}. La primera técnica, la **contrainmunolectroforesis (CIE)**, se basó en la detección de anticuerpos precipitantes o precipitinas contra una mezcla de antígenos totales de los serotipos más comunes basados en el antígeno O. En esta técnica, antígeno y anticuerpo son incorporados a un gel de agarosa en pocillos adyacentes, creándose gradientes de concentración para cada uno de ellos. Ambos componentes se mueven, con ayuda de la corriente eléctrica, el uno hacia el otro, de forma que el anticuerpo difunde en dirección al cátodo, mientras que el antígeno va hacia el ánodo al encuentro del anticuerpo, formándose bandas de precipitación en la zona de equivalencia. Una vez finalizada la electroforesis se añade un colorante para visualizar las bandas. El número de bandas se ha utilizado para distinguir pacientes colonizados e infectados ya que en pacientes sin infección es cero o una. El aumento progresivo del número de bandas de precipitación se ha correlacionado con el aumento gradual de infecciones por *P.aeruginosa* y también se ha demostrado que es un signo de mal pronóstico. La técnica de CIE tiene el inconveniente de ser poco sensible para identificar las fases iniciales de la colonización crónica. Las técnicas inmunoenzimáticas, como el enzima-inmunoensayo o el Western-blot pueden ser más sensibles.

El **Western-blot (WB)** es una técnica inmunoenzimática muy empleada inicialmente en la FQ para el estudio de las proteínas de *P.aeruginosa* y que se ha utilizado también ampliamente para la detección de anticuerpos anti *P.aeruginosa* en el suero de los pacientes con FQ. En una primera fase se separan los diferentes componentes antigénicos proteicos por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida (lineal o en gradiente). Posteriormente se realiza una transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, que se corta en

tiras y se bloquea la superficie de las tiras no ocupadas por los componentes proteicos del antígeno con otras proteínas como gelatina o proteínas de la leche. Una vez preparadas las tiras se siguen los pasos de cualquier técnica inmunoenzimática incubándolas en contacto con el suero, que contiene los anticuerpos a estudiar y en pasos sucesivos se añade el conjugado y el substrato lo cual permite la visualización de las bandas. En un estudio en el que se comparó CIE y WB usando antígeno soluble y analizando pares de sueros de pacientes con FQ recogidos antes del diagnóstico de infección por *P.aeruginosa* e inmediatamente después, el WB era una media de 32 veces más sensible que la CIE ⁶⁷. Para la detección de anticuerpos presenta una gran sensibilidad y especificidad y además permite el estudio de anticuerpos frente a diferentes componentes antigénicos simultáneamente, por lo que se ha utilizado sobre todo para el estudio de anticuerpos frente a antígenos totales ⁶⁸ u otras preparaciones complejas como las proteínas de membrana externa (PME) de *P.aeruginosa*^{37,67,69}. También se puede valorar cualitativamente por el número de bandas o su intensidad. A pesar de estas ventajas posee grandes inconvenientes, la fase previa de preparación de los reactivos es muy compleja, es una técnica lenta y es difícil de automatizar tanto la realización como la lectura e interpretación de los resultados. Todo ello la convierten en una técnica poco útil cuando se va a utilizar en la práctica asistencial y se requiere el análisis de un volumen importante de muestras.

Las técnicas de **enzimoinmunoanálisis (EIA)** son técnicas de cuantificación inmunológica. En el caso de su utilización para la detección cuantitativa de anticuerpos humanos en suero, éstos son fijados por un antígeno específico, unido a una fase sólida. Posteriormente se añade el conjugado, un anticuerpo anti inmunoglobulina humana marcado con un enzima, para poner de manifiesto esta unión. Los marcadores enzimáticos más habituales son la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina. Para visualizar la reacción, se añade el substrato adecuado, tras la incubación la reacción se detiene mediante la adición de una solución ácida o básica y la intensidad de color se estima fotométricamente mediante un espectrofotómetro. A diferencia de otras técnicas que también utilizan la cuantificación inmunológica, el marcador utilizado es un enzima, lo que ofrece múltiples ventajas. Entre las más importantes destacan que permite cuantificar la producción de anticuerpos específicos, permite analizar gran número de muestras por ser fácilmente

adaptable a la automatización y es una técnica de bajo coste, sencilla y con una vida media larga de los reactivos. Es la técnica más utilizada en los trabajos más recientes, aunque la comparación de los estudios publicados es compleja debido a la variedad de antígenos utilizados y las resultantes diferencias en la interpretación de los resultados. Se han comparado CIE y EIA utilizando preparaciones complejas como antígeno celular total soluble ⁶⁹ siendo la correlación entre ambas técnicas buena (97%).

Antígenos utilizados en las técnicas de EIA para detectar anticuerpos anti-*P.aeruginosa*. En las primeras técnicas de EIA utilizadas para diagnosticar la infección crónica por *P.aeruginosa*, se han utilizado preparaciones complejas como antígeno celular total soluble ⁷⁰ con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100% cuando se utiliza una única muestra. La sensibilidad aumentaba hasta el 93 % si el diagnóstico se basaba en un aumento del título en muestras pareadas, pero la especificidad disminuía al 87%. Si el resultado del EIA se comparaba con los resultados del cultivo del esputo, ante un resultado del EIA positivo la probabilidad de que *P.aeruginosa* se aísle persistentemente durante un periodo mínimo de 6 meses es del 92%.

También se han utilizado antígenos de superficie, demostrando mediante EIA títulos de anticuerpos IgG elevados ⁷¹ que se han asociado a peor situación clínica tanto en paciente con colonización intermitente como crónica. Los pacientes con colonización crónica tienen títulos de anticuerpos muy elevados mientras que los pacientes con aislamientos intermitentes, aunque generalmente los tienen más bajos, pueden mostrar tanto títulos elevados frente a *P.aeruginosa* como valores normales durante meses después de un cultivo positivo aislado. Esto presumiblemente refleja lo arbitrario de la división entre estos dos grupos basada exclusivamente en los resultados del cultivo microbiológico por lo que se ha argumentado que los resultados de la serología pueden predecir el aislamiento de *P.aeruginosa* en el esputo y ayudar a diferenciar entre estos dos grupos de pacientes, identificando el grupo de pacientes con riesgo elevado de desarrollar colonización crónica⁷². Así mismo, se han demostrado por EIA títulos de anticuerpos frente a las PME ^{35, 37, 73} y el LPS ³³ en pacientes colonizados por *P.aeruginosa* muy superiores a los que presentaban pacientes con FQ nunca colonizados o en adultos sanos sin FQ. En estos trabajos, la

detección de anticuerpos IgG en general no precede al hallazgo en el esputo de *P.aeruginosa*, pero en muchos pacientes los anticuerpos se positivaron precozmente ⁷⁴ tras el aislamiento en el esputo por lo que un resultado positivo de anticuerpos significaría exposición previa a *P.aeruginosa* y podría utilizarse para detectar la colonización en pacientes en los que no se puede obtener muestra de esputo al ser incapaces de expectorar.

Los antígenos purificados más utilizados en las técnicas de EIA, probablemente por su actividad patogénica en el establecimiento de la infección, han sido productos extracelulares como fosfolipasa C (FLC), elastasa (ELA), proteasa alcalina (PA) y exotoxina A (ETA) (^{32, 75-77}) Se han encontrado niveles de anticuerpos significativamente más elevados en pacientes con colonización crónica por *P.aeruginosa* en comparación con pacientes con colonización intermitente o no colonizados ⁷⁵ y los pacientes portadores de cepas mucoides muestran títulos más elevados que los colonizados por cepas no mucoides. En el caso de la FLC, los títulos son más elevados en el caso de infección dual por *P.aeruginosa* y *S.aureus* mientras que los otros tres antígenos muestran significativamente títulos más elevados en pacientes colonizados únicamente por *P. aeruginosa*. Los anticuerpos anti-*P.aeruginosa* más precoces aparecen frente a FLC, PA y ETA ⁵⁷ mientras que los anticuerpos frente a ELA parecen detectarse más tardíamente. Hay diferentes explicaciones para la respuesta diferenciada de anticuerpos frente a estas exoproteínas de *P.aeruginosa* que puede ser el reflejo de la producción secuencial de estos antígenos durante el establecimiento de la colonización pulmonar. Los pacientes con FQ pueden presentar una mayor exposición crónica a FLC, AP y ETA debido a la mayor producción de estas exoproteínas durante la colonización inicial. Alternativamente los pacientes con FQ pueden ser colonizados por diferentes cepas de *P aeruginosa* y aquellas capaces de establecer una colonización crónica pueden producir niveles más elevados de estas exoproteínas.

Aunque en pacientes con colonización crónica bien establecida los títulos de anticuerpos frente a la exoproteínas de *P aeruginosa* raramente descienden en respuesta al tratamiento ⁷⁶ en el resto de pacientes ⁷⁷ el tratamiento antibiótico produce un descenso en el título de anticuerpos frente a los cuatro antígenos, pero sólo los anti-ETA y anti-ELA descienden hasta niveles normales. Los títulos anti FLC son los menos influenciados por el

tratamiento antibiótico. Estos resultados probablemente implican un papel diferenciado para cada una de estas exoproteínas en el establecimiento de la colonización crónica y apoyan que los niveles de anticuerpos frente a las exoproteínas de *P. aeruginosa* puedan usarse también para valorar la respuesta al tratamiento en pacientes con FQ^{78,79}.

Investigación de anticuerpos en el diagnóstico y seguimiento de la infección por *P.aeruginosa*. En la mayoría de trabajos la detección de la respuesta inmune específica frente a *P.aeruginosa* se ha utilizado para identificar la infección crónica y diferenciarla de la simple colonización en pacientes con FQ. Sin embargo, la utilidad de la serología de *P.aeruginosa* es potencialmente mayor en el diagnóstico y seguimiento de la infección respiratoria inicial por este microorganismo. Sería especialmente útil sobre todo cuando no es posible la obtención de muestras adecuadas para cultivo procedentes de aparato respiratorio inferior, principalmente en niños muy pequeños que no pueden expectorar. En estos pacientes, la serología podría ser más sensible que el cultivo del exudado faríngeo que, aunque es el más utilizado por su obtención no invasiva, parece tener una sensibilidad insuficiente para predecir la infección por *P.aeruginosa* y por tanto, el seguimiento longitudinal mediante serología sería una estrategia más inocua y cómoda que la realización de bronoscopias recurrentes.

Algunos estudios longitudinales en los que se disponía de muestras de suero de pacientes desde el nacimiento, o al menos varios años antes del primer aislamiento de *P.aeruginosa*, han mostrado que la detección de anticuerpos específicos anti *P.aeruginosa* puede preceder al primer aislamiento por cultivo del microorganismo. La media de edad de detección de una respuesta de anticuerpos anti *P.aeruginosa* era de 15 meses mientras que la edad del primer aislamiento por cultivo en muestras de vías altas y bajas era de 21 y 23 meses, respectivamente⁵⁷. Así mismo, durante los primeros 3 años de vida, la respuesta de anticuerpos se detectaba una media de 12 meses antes que el primer cultivo orofaríngeo positivo⁸⁰. Por su interés, los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla-1.2.6.1 y se comentan por separado a continuación.

Tabla-1.2.6.1. Estudios longitudinales serología anti-*P.aeruginosa* en pacientes con FQ

Estudio	Nº pacientes Criterio inclusión Tipo estudio	Tipo muestra para cultivo <i>P.aeruginosa</i>	Detección anticuerpos	Antígenos utilizados	1 ^{er} título valorable respecto 1 ^{er} aislamiento
Brett et al 1988 ⁸¹	33 pacientes Primer cultivo + Longitudinal	Espuito (74%) Ex. faríngeo	EIE IgG	Antígeno superficie	24 m antes
Burns et al 2001 ⁵⁷	40 pacientes <15 meses Longitudinal	Ex. faríngeo Broncoaspira do	EIE (>1/100) WB (>1/5000) IgG	Exotoxina A Proteínas totales	3 m antes 8 m antes
West et al 2002 ⁸⁰	68 pacientes Cribado neonatal Longitudinal	Ex. faríngeo (≥1 colonias)	EIE (≥1/256) IgG+IgA+Ig M	Lisado celular Exotoxina A Elastasa	12 m antes 6 m antes 41 m después
Corech et al 2005 ⁸²	48 pacientes Cribado neonatal Longitudinal	Ex. faríngeo Espuito (<10%)	EIE (>1/500) IgG	Lisado celular Exotoxinas tipo III Exotoxina A	3 m antes 10-39 m después 48 m después

En el trabajo de Brett et al. ⁸¹, se investigó la presencia de IgG anti-*P.aeruginosa* por EIA utilizando antígenos de superficie en 33 pacientes en los que se había aislado por primera vez *P.aeruginosa*. En 24 pacientes (72,7%) el título de anticuerpos fue superior al de los controles un mínimo de 24 meses antes del primer aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo y en 5 (15%) aumentó en los 2 meses posteriores al primer aislamiento. En estos 29 pacientes (87,9%) el aislamiento intermitente de *P.aeruginosa* se acompañó de un aumento en el título de anticuerpos. Los 4 pacientes restantes se consideraron no infectados ya que el aislamiento de *P.aeruginosa* no fue acompañado de aumento del título de anticuerpos. Se administró tratamiento endovenoso anti-*Pseudomonas* en 15 pacientes y sólo en 5 el título de anticuerpos volvió a títulos inferiores a los valores normales consiguiéndose la erradicación mientras que en los restantes 10 se siguió aislando y únicamente hubo un descenso parcial del título de anticuerpos. Los autores concluyen que la detección de anticuerpos específicos permite detectar la infección por *P.aeruginosa* y al mismo tiempo diferenciarla de la colonización inofensiva. También pueden ser útiles para controlar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. La administración de esteroides a dos pacientes produjo un descenso del título de anticuerpos a pesar de que se siguió aislando el

microorganismo por lo que un inconveniente de la serología podría ser que el tratamiento continuo con esteroides podría alterar la respuesta inmunológica.

En el trabajo de Burns et al.⁵⁷ se incluyeron 40 pacientes controlados durante 3 años en los que se obtenía una muestra de LBA anual y muestras de suero y FF cada tres meses, una de ellas coincidiendo con la broncoscopia. Las técnicas utilizadas para la detección de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* fueron western-blot, utilizando proteínas celulares totales como antígeno, y un EIA para detectar específicamente anticuerpos anti-Exotoxina A. De los 108 cultivos de LBA realizados, fueron positivos a *P.aeruginosa* el 18%, 34% y 33% durante el primer, segundo y tercer año de seguimiento, respectivamente. En total durante los 3 primeros años, se aisló *P. aeruginosa* en 29 pacientes (72.5%), pero utilizando los resultados combinados del cultivo y la serología, el 97.5% de los pacientes muestran infección antes de los 3 años. Estos resultados sugieren que la colonización por *P.aeruginosa* tiene lugar muy temprano en el curso de la FQ y puede ser intermitente o indetectable por cultivo. La serología puede predecir mayor incidencia de infección que el cultivo por varias razones. La primera es que un cultivo positivo requiere la presencia de microorganismos viables. Segundo, es que la respuesta inmune positiva puede indicar tanto infección pasada como actual. De hecho, “infección” se distingue frecuentemente de “colonización” basándose en la respuesta de anticuerpos ya que el aislamiento de la bacteria no indica necesariamente infección.

En el trabajo de West et al.⁸⁰, se obtuvieron muestras orofaríngeas y sueros a intervalos de 6 meses durante un periodo de 5 años en 68 pacientes con FQ. Las muestras de esputo expectorado representaban menos del 10% de las muestras. Se investigó IgG, IgA y IgM por EIA y usando como antígeno lisado celular, exotoxina A y elastasa. Se encontraron títulos $\geq 1/256$ frente al lisado celular total y a la exotoxina A en una media de 11,9 ($P<0.001$) y 5,6 ($P= 0,04$) meses, respectivamente, antes del primer aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo. No encontraron significación estadística entre el título de anticuerpos y el score clínico utilizado en el trabajo. Señalan que aunque frecuentemente no se había encontrado *P.aeruginosa* en el cultivo del exudado faríngeo, la combinación de un título 1/256 o superior junto con indicadores clínicos de infección harían sospechar la

presencia del microorganismo. Una vez aislada por primera vez, la presencia de títulos elevados o su aumento puede preceder hasta en tres años a la instauración de la infección crónica. Los autores concluyen que la infección inicial por *P.aeruginosa* en pacientes diagnosticados por cribado neonatal tiene lugar entre 6 y 12 meses antes de que la bacteria se aisle mediante cultivo y que por tanto el control continuado mediante serología facilitaría la identificación de la infección inicial por *P.aeruginosa* en niños pequeños con FQ diagnosticados por cribado neonatal.

Por último, el trabajo de Corech et al.⁸² estudia la aparición longitudinal de anticuerpos frente a los componentes del sistema tipo III de *P.aeruginosa* en 48 niños con FQ en los que se obtuvieron muestras de exudado orofaríngeo y suero cada 6 meses. El Sistema tipo III de *P. aeruginosa* consiste en tres complejos proteicos que incluyen 4 citotoxinas (ExoS, ExoT, ExoU, y ExoY) además de otras proteínas que inducen la formación de poros en la membrana de la célula diana (PopB y PopD). El orden de seroconversión frente a los distintos antígenos de *P. aeruginosa* (Exotoxina A, ExoS, PopB y lisado celular) es similar usando western-blot y EIA con una detección más precoz usando EIA. La media de edad del primer aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo del exudado faríngeo fue de 30 meses. El 96% de las seroconversiones iniciales se detectaron usando como antígeno el lisado celular, 94% con una mezcla de ExoS/PopB, 83% con ExoS, y 75% con Exotoxina A. La media de edad de la seroconversión fue de 27 meses para el lisado celular, 40 meses para la mezcla ExoS/PopB, 60 meses para ExoS y 78 meses para Exotoxina A, siendo estadísticamente significativas las diferencias entre los resultados obtenidos utilizando lisado celular y ExoS/PopB que detectan la seroconversión más precozmente que cuando se utiliza aisladamente ExoS o Exotoxina A. Los autores concluyen que los niños con FQ se colonizan precozmente con cepas de *P.aeruginosa* que expresan las toxinas del sistema tipo III, implicado en la patogénesis inicial de la bacteria y por tanto el seguimiento clínico junto con el cultivo del exudado orofaríngeo y la serología puede facilitar la detección precoz de la infección inicial por *P.aeruginosa*.

La comparación de estos estudios longitudinales es compleja dadas las diferencias en los antígenos y metodologías utilizados. En general la detección de anticuerpos es más

precoz si se utilizan preparaciones complejas de antígeno como proteínas totales, proteínas de membrana externa o lisado celular. Uno de los principales inconvenientes de estos métodos es la falta de técnicas comercializadas con suficiente estandarización ⁸³.

Los antígenos purificados más utilizados, como los productos extracelulares elastasa (ELA) y exotoxina A (ETA), son más fáciles de normalizar. Se ha comercializado un equipo (Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA de Mediagnost, Alemania) que permite la detección de anticuerpos de forma diferenciada frente a ETA, PA y ELA de *P.aeruginosa*, con la consiguiente ventaja en cuanto a estandarización y control de calidad necesarios en el ámbito asistencial. Este equipo comercial o técnicas similares de preparación propia se han evaluado en pacientes con FQ en algunas publicaciones ⁸⁴⁻⁸⁷ discriminando bien entre pacientes libres o con aislamiento de *P.aeruginosa* aunque con una sensibilidad variable para los diferentes antígenos del 33 al 85% (Tabla-1.2.6.2).

Tabla-1.2.6.2. Sensibilidad y especificidad de la detección anticuerpos anti-*P.aeruginosa* en pacientes con FQ colonizados por *P.aeruginosa*.

Estudio	Nº Pacientes	Técnica utilizada Antígeno utilizado (punto de corte)	Grupos de pacientes	Sensibilidad (%) / Especificidad (%) ¹			
				PA ¹	ELA ²	ETA ³	total
Kappler et al 2006 ⁸⁴	183	EIA (comercial) Exotoxina A (>1/500) Proteasa alcalina (>1/500) Elastasa (>1/500)	No colon. (37%) Intermitentes (15%) Crónicos (48%)	64/99	53/100	73/96	86/96
Tramper et al 2006 ⁸⁶	220	EIA (comercial) Exotoxina A (>1/35) Proteasa alcalina (>0) Elastasa (>0)	No colon. (31%) Intermitentes (27%) Crónicos (42%)	48/97	65/89	65/81	-
Ratjen et al 2007 ⁸⁵	375	EIA (no comercial) Exotoxina A (>1/1000) Proteasa alcalina (>1/285) Elastasa (>1/300)	No colon. (53%) Intermitentes (3%) Crónicos (44%)	85/97	76/97	72/97	93/93
Da Silva et al. 2007 ⁸⁷	87	EIA (no comercial) Exotoxina A (>1/1000) Proteasa alcalina (>1/285) Elastasa (>1/300)	No colon. (16%) Intermitentes (20%) Crónicos (51%)	47/94	63/100	33/100	69/94

¹PA = Proteasa alcalina, ELA = Elastasa, ETA = Exotoxina A

Las divergencias en los resultados de estos trabajos no pueden explicarse sólo por las distintas técnicas y antígenos empleados si no que pueden ser atribuibles a la utilización de diferentes puntos de corte para definir los resultados positivos y a diferencias en los criterios para definir los grupos de pacientes según el estadio de colonización pulmonar por *P.aeruginosa*. Algunos autores utilizan el criterio más clásico que valora los resultados de los cultivos en un periodo de 6 meses, mientras que otros utilizan periodos más largos entre 1-3 años. Por otra parte, los puntos de corte basados únicamente en pacientes infectados crónicamente pueden no ser representativos de la población general de pacientes con FQ y utilizar puntos de corte elevados hace que no se valoren títulos bajos de anticuerpos que pueden ser relevantes durante la infección inicial por *P.aeruginosa*.

Por tanto, son necesarios estudios prospectivos y longitudinales para establecer si la determinación regular del título de anticuerpos frente a *P.aeruginosa* en los pacientes sin aislamiento previo de *P.aeruginosa* o en los que tienen aislamientos intermitentes tendría valor pronóstico. En los pacientes sin aislamiento previo de *P.aeruginosa*, un aumento del título de anticuerpos durante el seguimiento supondría una sospecha elevada de infección por *P.aeruginosa* a pesar del resultado negativo de los cultivos y algunos autores recomiendan tratar aún en ausencia de aislamiento de la bacteria por cultivo. En el grupo de pacientes con aislamientos intermitentes de *P.aeruginosa* un título elevado de anticuerpos apuntaría a un fracaso en la erradicación de la bacteria, mientras que la ausencia de anticuerpos o un título bajo se correlacionaría con el éxito en su eliminación.

Una vez diagnosticada la infección inicial, la determinación regular del título de anticuerpos puede ser de utilidad para estudiar la respuesta al tratamiento precoz con antibióticos. Se han encontrado descensos significativos frente a ETA y AP en los pacientes capaces de eliminar la bacteria mientras que en los que fracasan a pesar del tratamiento precoz se observa un aumento significativo en el título de anticuerpos. Una vez establecido el diagnóstico de infección crónica, la detección de anticuerpos frente a *P.aeruginosa* probablemente carece de valor pero no así en los pacientes sin aislamiento previo de *P.aeruginosa* o en los que tienen aislamientos intermitentes ya que en ellos podría tener valor pronóstico

En resumen, la determinación de anticuerpos anti- *P. aeruginosa* en pacientes con FQ podría dar información sobre una infección previa no detectada mediante el cultivo convencional. Los anticuerpos pueden permanecer detectables durante meses debido a su prolongada vida media con lo que se amplía el periodo durante el que la prueba es positiva. Así mismo, existen datos sobre su uso potencial en el seguimiento de los pacientes tras una terapia de erradicación.

Por otra parte, las técnicas de detección de anticuerpos anti *P.aeruginosa* podrían ser de utilidad en otras situaciones distintas a los pacientes con FQ. La evolución de algunos pacientes con bronquiectasias no afectos de FQ, si tenemos en cuenta los resultados del control bacteriológico del esputo, es similar a la observada en los pacientes con FQ. En un primer período se aíslan principalmente *H.influenzae*, *S.aureus* o *S.pneumoniae* en el esputo. Le sigue un segundo período en el que el principal agente implicado es *P.aeruginosa*, que acabará infectando crónicamente al paciente en la mayoría de los casos (1). Una hipótesis plausible es suponer que, al igual que ocurre en la FQ, en pacientes con bronquiectasias sin FQ la producción de títulos elevados de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* desempeñe un papel importante en la etiopatogenia de la infección crónica por *P.aeruginosa*.⁸⁸. La mayoría de pacientes con bronquiectasias sin fibrosis quística son personas mayores, y se presentan los mismos problemas para realizar un estudio microbiológico completo, aparte de que no suelen realizarse controles con tanta frecuencia. También en infecciones graves por *P.aeruginosa* como septicemia, osteítis o neumonía se han demostrado títulos crecientes de anticuerpos frente a exotoxina A o fosfolipasa C en casi un 70% de los pacientes⁸⁹.

1.2.7. Detección del DNA de *P. aeruginosa* en muestras respiratorias

Aunque el cultivo es la técnica utilizada habitualmente para la detección de *P.aeruginosa*, en pacientes con tratamiento antimicrobiano o con baja carga bacteriana, el cultivo puede ser negativo o pueden ser necesarios varios días hasta conseguir el aislamiento de la bacteria y su identificación. La utilización de técnicas moleculares puede evitar las limitaciones asociadas al cultivo convencional aumentando la sensibilidad ya que puede detectar microorganismos incapaces de crecer en el cultivo. Por el contrario, las técnicas

moleculares no distinguen entre bacterias vivas y muertas y pueden detectar bacterias eliminadas con tratamientos antimicrobianos anteriores.

El límite inferior de detección de las técnicas de biología molecular es más bajo que el cultivo y en general presentan una alta sensibilidad aunque se desconoce si esto ofrece ventajas potenciales en cuanto a disminuir la morbilidad y mortalidad asociadas a la colonización por *P.aeruginosa*. La detección de ADN a partir de muestras respiratorias es simple y no se ve afectada por la viabilidad de las bacterias, la competencia por los nutrientes o la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano. A la vez puede permitir una identificación de *P.aeruginosa* más rápida ya que podría realizarse directamente a partir de las muestras respiratorias.

Las técnicas de hibridación in situ como FISH (Fluorescent in situ hybridization) se han utilizado ⁹⁰ para la detección de los principales patógenos (*P.aeruginosa*, *S.aureus*, *H.influenzae*, *B.cepacia*, *Burkholderia spp.* y *S.maltophilia*) en pacientes con FQ. Estas técnicas presentan buena especificidad pero una sensibilidad menor que la del cultivo, ya que requieren alta densidad de colonización, superior a 4×10^5 UFC/ml, para dar un resultado positivo. Es por tanto mejor utilizar técnicas de amplificación con una mayor sensibilidad.

Las técnicas moleculares de amplificación del DNA como la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) tienen la capacidad de detectar e identificar microorganismos mediante la amplificación de secuencias únicas de un microorganismo particular por lo que tienen gran especificidad. Además presentan una sensibilidad muy alta ya que son capaces de detectar entre 10^2 UFC/ml ^{91,92} y 8×10^3 UFC/ml ⁹³ en el caso de *P.aeruginosa* dependiendo de las técnicas utilizadas.

Principales dianas utilizadas en la detección del DNA de *P.aeruginosa*. Entre los genes que se han utilizado con mayor frecuencia como diana para este microorganismo se encuentran:

- **El gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosómico.** La amplificación por PCR de los genes ribosomales seguida de la posterior

secuenciación y comparación con bases de datos, se han utilizado para identificar prácticamente todos los microorganismos y ha permitido identificar nuevas especies. Se utiliza fundamentalmente para la identificación de gérmenes previamente aislados por cultivo.

- **El gen *groES***. Codifica una proteína de choque térmico y permite detectar *Pseudomonas spp.* y posteriormente diferenciar *P.aeruginosa* por el patrón de RFLP

- **El gen *oprI***. Codifica una lipoproteína de membrana externa implicada en el sistema de expulsión activo y en la permeabilidad. Está muy conservado entre los diferentes miembros del género *Pseudomonas* pero no es específico de *P.aeruginosa*

- **El gen *oprL***. Codifica una lipoproteína de membrana externa y es específico de *P.aeruginosa* incluidas las colonias no pigmentadas y las mucoides

- **El gen *algD***. Codifica la GDP manosa deshidrogenasa (Guanosina diphospho-D-manosa dehydrogenase) que interviene en el metabolismo de la manosa y es necesaria en la síntesis de alginato

- **El gen de la exotoxina A (*toxA*)**, que es producida por la mayoría de las cepas de *P.aeruginosa*.

- **El gen *ecfX***. Codifica un factor implicado en la transcripción que es específico de *P.aeruginosa*, y puede tener un papel en su virulencia.

- **El gen *gyrB***, que codifica la subunidad B de la DNA girasa. El enzima está formado por dos subunidades. La A separa y vuelve a unir el DNA; la B cataliza la hidrólisis del ATP. El enzima forma un tetrámero A₂B₂. Se puede amplificar exclusivamente en *P.aeruginos*, utilizando cebadores específicos

Principales técnicas utilizadas en la detección del DNA de *P.aeruginosa*. Se han publicado diferentes técnicas de PCR para la detección e identificación de *P.aeruginosa* utilizando estas dianas. La mayoría se han valorado usando cepas de referencia o aisladas por cultivo a partir de muestras clínicas o ambientales. En muy pocos estudios se han presentado datos obtenidos analizando directamente muestras clínicas sin cultivo previo. Los resultados se resumen en la Tabla-1.2.7.1.

Tabla-1.2.7.1. Técnicas de PCR descritas para la detección e identificación de *P.aeruginosa*

Estudio	Tipo técnica	Genes diana (tamaño amplicón)	Número cepas y/o muestras	Tipo cepas ¹ y/o muestras	Sensibilidad / Especificidad
Khan et al 1994 ⁹⁴	PCR convencional	<i>toxA</i> (396 pb)	165 cepas	95PA/35otras P no PA / 35 otros BGN	96 % / 100%
De Vos et al 1997 ⁹¹	PCR multiplex convencional	<i>oprL</i> (504 pb)	20 cepas/ 82 muestras	PA/ otra P/ otros BGN B. cutánea/esputo	100% / 100% 100% / 74% ²
Da Silva et al 1999 ⁹³	PCR convencional	<i>algD</i> (520 pb)	202 cepas 15 muestras	182PA/ 20otras P no PA 8 pos PA/ 7 pos otros	100% / 100% 87,5% / 85,7% ²
Qin et al 2003 ⁹⁵	PCR tiempo real	<i>oprI</i> (330 pb) <i>algD</i> (520 pb) <i>toxA</i> (367 pb) <i>gyrB</i> (222 pb)	204 cepas	113 PA/ 91 no PA	100% / 99% 81% / 100% 95,5% / 100% 100% / 100%
Xu et al 2004 ⁹⁸	PCR convencional	<i>oprL</i> (504 pb) <i>toxA</i> (367 pb)	57 muestras	30 esputo pos PA / 27 esputo neg PA	83% / 67% ² 73% / 89% ²
Spilker et al 2004 ⁹⁶	PCR convencional	16S rDNA (956pb)	85 cepas	14 PA/ 28 P no PA/ 43 otros BGN	100% / 100%
Lavenir et al 2007 ⁹⁷	PCR convencional	16S rDNA (956pb) <i>oprL</i> (504 pb) <i>toxA</i> (367 pb) <i>gyrB</i> (222 pb) <i>ecfX</i> (528pb)	74 cepas	59 PA / 15 P no PA	100% / 94% 100% / 86% 95% / 100% 100% / 100% 100% / 100%
Motoshima et al 2007 ¹⁰⁰	PCR tiempo real	<i>gyrB</i> (222 pb)	224 cepas 108 muestras	104 PA / 120 P no PA Esputos 54 pos PA	100% / 100% 100% / 96,4%
Anuj et al 2009 ¹⁰¹	PCR convencional y tiempo real	16S rDNA (956pb) <i>oprL</i> (504 pb) <i>toxA</i> (396 pb) <i>gyrB</i> (222 pb) <i>ecfX</i> (63pb)	91 cepas	64PA / 27 no PA	100% / 92,6% 100% / 85,2% 98,4% / 100% 100% / 100% 100% / 100%
Deschaght et al 2010 ¹⁰²	PCR tiempo real	<i>oprL</i> (504 pb)	852 muestras	Esputos, EF 755 cu pos/ 98 cu neg	90% / 85% ²
Logan et al 2010 ¹⁰³	PCR multiplex tiempo real	<i>algD</i> (130 pb) <i>gyrB</i> (100 pb)	2099 muestras	851 esputos 1248 EF	94,4% / 94,6%
McColloch et al 2011 ¹⁰⁶	PCR tiempo real	<i>23S rDNA</i> (-) <i>P.aeruginosa</i>	542 muestras	500 EF 42 esputo	100% / 94,1% ² 100% / 50% ²

¹ PA = *P.aeruginosa*, P no PA = *Pseudomonas* no *P.aeruginosa*, BGN= Bacilos Gram negativos, EF = exudado faríngeo

² respecto al resultado del cultivo

Utilizando PCR y cepas previamente identificadas se obtiene entre 81 y 100% de sensibilidad con una especificidad del 85 al 100% dependiendo de la región amplificada y de los cebadores utilizados^{91, 93-97, 100, 101}. Uno de los mejores resultados en cepas previamente aisladas por cultivo, con sensibilidad y especificidad del 100%, se obtiene con la amplificación del gen *gyrB* que genera el amplicón de menor tamaño con 222 pares de bases^{95, 97, 100, 101}.

En las publicaciones en las que se han valorado las técnicas de PCR directamente en muestras utilizando los resultados del cultivo convencional como técnica de referencia, se han hallado sensibilidades del 73 al 100% con especificidades del 67 al 89%^{91,93,98,100,102,103}. La especificidad es mayor cuando la comparación se basa en cepas claramente caracterizadas que cuando se compara con los resultados del cultivo convencional. La baja especificidad calculada debida a los resultados positivos de PCR con cultivo negativo podría atribuirse a falsos positivos de las técnicas de PCR por contaminación o amplificaciones inespecíficas. La contaminación con amplicones procedentes de PCR anteriores es poco probable si se respetan las buenas prácticas del laboratorio molecular y se incluyen controles negativos y es aún más difícil que ocurra utilizando técnicas de PCR en tiempo real. La amplificación inespecífica de otras bacterias relacionadas se pueden evitar seleccionando dianas específicas para *P.aeruginosa* o utilizando más de una. Es más plausible atribuir estas discrepancias a falsos resultados negativos del cultivo por la interferencia de otras bacterias que impide el crecimiento de *P.aeruginosa*, por errores en la identificación fenotípica de los aislamientos, por la presencia de organismos no viables o porque sea el inicio de la colonización que se detectará posteriormente también en el cultivo convencional. En ninguna de las publicaciones se presenta el seguimiento posterior de los pacientes excepto en una (98) en la que el 50% de los pacientes con cultivo negativo y PCR positiva, se demostró un cultivo positivo posterior en una media de 4,5 meses después. Así pues, las técnicas moleculares podrían permitir detectar la colonización por *P.aeruginosa* antes que el cultivo convencional.

Actualmente las técnicas de PCR más interesantes por sus ventajas para adaptarla a la práctica asistencial son las técnicas de **PCR en tiempo real**, una variante de la reacción en cadena de la polimerasa que permite realizar la amplificación y detección del DNA amplificado simultáneamente. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, el ADN que queremos amplificar y que utilizará como molde, los dos cebadores específicos, los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable. Las diferencias estriban en que a la mezcla de reacción se añade además un fluorocromo o fluoróforo que permitirá ir marcando las moléculas de DNA que se vayan sintetizando y que la reacción se lleva a cabo en un termociclador con sensores para medir la fluorescencia que se va generando y que será proporcional al DNA formado. La medición de fluorescencia se realiza en cada ciclo de amplificación por lo que la técnica

recibe la denominación de PCR en tiempo real por contraposición a la PCR convencional en la que la detección del DNA amplificado se realiza al finalizar la amplificación y por tanto es una PCR a “tiempo final”.

Las técnicas de PCR en tiempo real se pueden clasificar según se realice el marcado del ADN amplificado utilizando sondas moleculares unidas a fluoróforos, específicas de la secuencia amplificada o bien con fluorocromos no específicos. Las primeras utilizan un oligonucleótido marcado fluorescentemente (sonda), complementario de una zona intermedia del amplicón y que emite fluorescencia únicamente cuando la sonda ha hibridado con el ADN diana que es sintetizado durante la reacción de PCR. En las técnicas de PCR en tiempo real que emplean fluorocromos no específicos, éstos se unen inespecíficamente al ADN de doble cadena que se va sintetizando exponencialmente durante la PCR. Posee la ventaja de requerir sólo el par de cebadores para efectuar la amplificación sin necesidad de utilizar sondas marcadas, lo que abarata su coste; por contra, sólo es posible amplificar un producto en cada reacción. El colorante más empleado es el SYBR Green, que, cuando es excitado mediante luz azul ($\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$) emite luz verde ($\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$) que es detectada por el sensor de fluorescencia del termociclador. Cuando se utiliza SYBR Green, es posible identificar los fragmentos de DNA amplificados a partir de la temperatura de fusión (**T_m** =*melting Temperature*), que es específica para cada fragmento amplificado. La **temperatura de fusión** se obtiene a partir de la curva de disociación del DNA amplificado que puede realizarse al final de protocolo de PCR en tiempo real sin necesidad del posterior empleo de técnicas de electroforesis para la visualización y cálculo del tamaño de la banda que se realiza en la técnica de PCR convencional.

Además, mediante PCR en tiempo real es posible cuantificar el ADN amplificado si se dispone de estándares con un número de copias conocidas del DNA que se quiere amplificar en concentraciones decrecientes y que se amplifican en las mismas condiciones que las muestras. Para cada concentración de estándar y muestra se determina el ciclo umbral (**CT** = *Cycle Threshold*), es decir el primer ciclo en que sobrepasa el umbral de detección de fluorescencia y por tanto, en el que se considera positiva la prueba. Para que la recta de calibrado sea lineal, se representan los valores de los **CT** de cada estándar frente al logaritmo

de su concentración. De este modo, cuando una muestra es positiva y por tanto se conoce su CT se puede extrapolar en la recta de calibración la concentración del DNA inicial presente en la muestra.

Antes de aplicar estas técnicas con finalidad diagnóstica necesitan ser validadas (99) en muestras clínicas ya que los escasos resultados publicados se han obtenido con cepas previamente aisladas por cultivo. Además, para estudiar la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos por estas técnicas en pacientes con FQ son necesarios estudios longitudinales con muestras respiratorias que sean analizadas simultáneamente por PCR y cultivo convencional.

2. OBJETIVOS

Justificación del estudio

La baja sensibilidad del cultivo del exudado faríngeo en pacientes pediátricos con FQ incapaces de expectorar, hace necesario valorar técnicas complementarias al cultivo convencional para mejorar el seguimiento microbiológico de la colonización por *P.aeruginosa*.

Hipótesis

1- Para la detección de la colonización por *P.aeruginosa* en pacientes con FQ en los que no se pudiera obtener muestra de esputo, la utilización de técnicas de biología molecular para detectar la presencia del DNA de *P.aeruginosa* en muestras de exudado faríngeo mejoraría la sensibilidad frente al cultivo convencional.

2- La determinación del título de anticuerpos específicos frente a *P.aeruginosa* en pacientes con FQ sería un complemento útil al cultivo convencional mejorando la sensibilidad en la detección precoz de la colonización por este microorganismo sobre todo en pacientes en los que no se pueden obtener muestras de esputo. En los pacientes sin aislamiento previo de *P.aeruginosa*, un aumento del título de anticuerpos durante el seguimiento indicaría colonización por *P.aeruginosa* a pesar del resultado negativo de los cultivos. En los pacientes con aislamientos de *P.aeruginosa*, un título elevado de anticuerpos indicaría fracaso en la erradicación de la bacteria, mientras que la ausencia de anticuerpos o un título bajo se correlacionaría con el éxito en su eliminación.

El **objetivo principal** del estudio ha sido evaluar los resultados de tres técnicas microbiológicas: el cultivo convencional, la detección del DNA de *P.aeruginosa* y la detección de anticuerpos específicos anti *P.aeruginosa* en el diagnóstico y seguimiento de la colonización respiratoria por *P.aeruginosa* en pacientes pediátricos con FQ, atendiendo especialmente al diagnóstico en tres situaciones, pacientes no colonizados, pacientes con colonización actual, y pacientes con colonización crónica.

Los **objetivos pormenorizados** del estudio han sido:

1. Poner a punto técnicas de PCR en tiempo real para la detección cuantitativa del DNA de *P.aeruginosa* en muestras de frotis faríngeo. Seleccionar las técnicas con mejores resultados.

2. Seleccionar y valorar distintos puntos de corte de las técnicas cuantitativas de PCR en tiempo real para la detección del DNA de *P.aeruginosa* en el diagnóstico de la colonización por este microorganismo.

3. Reevaluar las técnicas de detección de anticuerpos–frente a tres antígenos (Exotoxina A, Proteasa alcalina y Elastasa) de *P.aeruginosa* ya utilizados para el diagnóstico de la colonización crónica por este microorganismo. Seleccionar y valorar distintos puntos de corte para mejorar su capacidad para el diagnóstico de la colonización tanto inicial o intermitente, como crónica.

4- Recoger los datos del seguimiento microbiológico habitual durante un periodo mínimo de 10 años antes y 2 años después de la cada una de las muestras incluidas en el estudio. Estos datos se han utilizado para la clasificación del estadio de colonización por *P.aeruginosa*.

5 Analizar y comparar los resultados obtenidos mediante la detección del DNA de *P.aeruginosa* con la detección de anticuerpos y los resultados del cultivo convencional.

El **trabajo** ha incluido dos partes:

1. Análisis de los resultados de las muestras de pacientes con situación estable microbiológicamente en diferentes estadios de colonización por *P.aeruginosa* para la puesta

a punto de las técnicas y poder establecer los mejores puntos de corte para diferenciar pacientes colonizados y no colonizados y pacientes con y sin colonización crónica.

2. Análisis de los resultados de las distintas técnicas en el diagnóstico de la colonización por *P.aeruginosa* en pacientes para los que existía un periodo mínimo de dos años de seguimiento.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras analizadas

Se han analizado 817 muestras de 128 pacientes atendidos en la unidad de Fibrosis Quística del Servicio de Neumología Pediátrica del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona a los que se les había realizado detección de anticuerpos frente a *P.aeruginosa*. Dentro del seguimiento microbiológico habitual y coincidiendo con la recogida de la muestra de sangre para la detección de anticuerpos, se realizaba cultivo convencional en muestra de exudado faríngeo que se utilizó también para la detección del DNA de la bacteria. Se han recogido los resultados del cultivo microbiológico de todas las muestras respiratorias analizadas en el seguimiento habitual durante los 10 años anteriores y los dos años posteriores a la toma de cada una de las muestras incluidas en el estudio.

Para definir el estadio de colonización por *P.aeruginosa* se han utilizado los criterios de Leeds⁵¹. Basándose en estos criterios, se han definido como no colonizado por *P.aeruginosa* cuando no se hubiera aislado este germen en las muestras respiratorias cultivadas durante el periodo de un año. Los no colonizados se han diferenciado entre nunca colonizados, si nunca habían presentado ningún aislamiento de *P.aeruginosa*; no colonizados con antecedentes de colonización inicial, cuando hubieran tenido un primer aislamiento de *P.aeruginosa* sin aislamientos posteriores positivos o bien con aislamientos separados por periodos superiores a un año; y no colonizados pero con antecedentes de colonización previa intermitente o crónica. Se han definido como colonizados intermitentemente cuando el 50% o menos de los cultivos realizados durante el periodo de un año hubieran sido positivos a *P.aeruginosa* con al menos un cultivo positivo. Se ha considerado como colonización crónica cuando más del 50% de los cultivos hubieran sido positivos durante un año. Estos criterios se resumen en el Tabla-3.1.1.

Tabla-3.1. 1. Definición de los estadios de colonización

Estadio de colonización		Resultado de los cultivos de las muestras respiratorias durante el año previo o posterior a la toma de la muestra
Sin colonización actual	Nunca colonizados	Todos los cultivos negativos para <i>P.aeruginosa</i> . Sin antecedentes de aislamiento previo
	Colonización inicial	Todos los cultivos negativos para <i>P.aeruginosa</i> . Con antecedentes de un primer cultivo positivo para <i>P.aeruginosa</i> sin aislamientos positivos posteriores. Un nuevo cultivo positivo después de más de 1 año de cultivos negativos se ha considerado un nuevo episodio de colonización inicial
	Colonización previa	Todos los cultivos negativos para <i>P.aeruginosa</i> . Con antecedentes de colonización previa intermitente o crónica
Colonización intermitente		≤50% de todos los cultivos positivos para <i>P.aeruginosa</i> con al menos un cultivo positivo
Colonización crónica		>50% de todos los cultivos positivos para <i>P.aeruginosa</i>

3.1.1 Muestras de pacientes estables microbiológicamente

En el estudio para seleccionar los puntos de corte óptimos se han incluido 116 muestras de suero y exudado faríngeo de otros tantos pacientes con situación estable microbiológicamente respecto a la colonización por *P.aeruginosa*. En los 12 pacientes de los que no se incluyeron muestras, en 6 no se disponía de suficiente seguimiento previo y/o posterior a la obtención de las muestras, 5 no tuvieron ningún periodo de estabilidad microbiológica entre el periodo de un año anterior y posterior a la obtención de ninguna de las muestras y un caso era portador de una única mutación de FQ con prueba del sudor normal y se excluyó.

Se ha definido como situación estable el que no hubiera cambiado el estadio de colonización por *P.aeruginosa* durante el año previo y posterior a la obtención de las muestras incluidas en el estudio. Se ha incluido la primera muestra en la que se cumplía esta condición para cada uno de los pacientes. De esta forma se ha intentado conseguir una

separación más clara entre muestras de pacientes no colonizados, con colonización intermitente y con colonización crónica al valorar un periodo de dos años con una situación estable durante este tiempo. Las muestras de pacientes no colonizados se han dividido a su vez en tres grupos según nunca se hubiera aislado *P.aeruginosa*, tuvieran antecedentes de colonización inicial o tuvieran antecedentes de haber estado con anterioridad colonizados intermitente o crónicamente por *P.aeruginosa*.

Siguiendo estos criterios las 116 muestras se han distribuido en 5 grupos:

-Grupo 1: 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*.

-Grupo 2: 27 muestras de pacientes sin colonización actual por *P.aeruginosa* con antecedentes de colonización inicial

-Grupo 3: 22 muestras de pacientes sin colonización actual por *P.aeruginosa* con algún periodo anterior de colonización intermitente o crónica.

-Grupo 4: 26 muestras de pacientes con colonización intermitente por *P.aeruginosa*.

-Grupo 5: 17 muestras de pacientes con colonización crónica por *P.aeruginosa*.

Para la inclusión de las muestras, se requirió que se hubiera realizado un periodo de control microbiológico mínimo de un año previo y posterior a la obtención de las muestras de suero y exudado faríngeo utilizadas en el estudio. Así mismo, se requirió que este periodo de seguimiento microbiológico se hubiera realizado con un mínimo de tres cultivos de muestras de esputo o exudado faríngeo valorables anuales, separados al menos por un mes. La única excepción la han constituido las muestras de pacientes que por su edad inferior a un año, no tenían un año de seguimiento previo a la toma de las muestras.

3.1.2 Muestras de pacientes con seguimiento durante 24 meses

Se han incluido 471 muestras de suero y exudado faríngeo de 68 pacientes a los cuales se les había realizado seguimiento serológico durante un mínimo de 24 meses. Los criterios para la inclusión fueron:

1- Un periodo de control microbiológico mínimo de un año previo y posterior a la primera y última muestras incluidas en el periodo de seguimiento analizado, con un mínimo de tres cultivos de muestras de esputo o exudado faríngeo valorables anuales en el seguimiento microbiológico habitual, separados al menos por un mes. La única excepción la han constituido la primera muestra incluida en el estudio de los pacientes que por su edad inferior a un año, no tenían un año de seguimiento previo.

2- Mínimo 4 determinaciones de anticuerpos y 4 muestras simultáneas de exudado faríngeo para cultivo y detección del DNA de la bacteria durante los dos años de seguimiento analizado.

Se han analizado dos grupos:

-Grupo A, 231 muestras pertenecientes a 33 pacientes sin aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo durante los 24 meses de seguimiento analizado.

-Grupo B, 240 muestras pertenecientes a 35 pacientes con aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo durante los 24 meses de seguimiento analizado.

3.2. Procesamiento de las muestras y controles

Las muestras respiratorias para cultivo convencional se habían procesado de la forma habitual en el laboratorio de microbiología. Las muestras de esputo se homogenizaron con N-acetil cisteína previamente al cultivo. Las muestras de exudado faríngeo se sembraron directamente. Las muestras se sembraron en agar macConkey se incubaron durante 48 horas a 37°C mientras que el agar sangre y agar chocolate se incubaron en atmosfera con un 5% de CO₂. Las placas se leyeron a las 24 y 48 horas y los microorganismos aislados se identificaron mediante métodos convencionales.

Para la realización de las técnicas de PCR, las muestras de exudado faríngeo se resuspendieron en 1 ml de suero fisiológico estéril. La extracción y purificación de los ácidos nucleicos de las suspensiones estándares de *P.aeruginosa* y de las muestras de exudado faríngeo se realizó mediante el sistema EasyMag® de bioMerieux, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ha utilizado un volumen de muestra de 500 µl y un volumen

de elución de 25 µl. Los eluidos se conservaron a -20°C hasta la realización de las técnicas de PCR.

Las muestras de sangre para la detección de anticuerpos frente a *P.aeruginosa* se habían obtenido y procesado de la forma habitual. La sangre sin anticoagulantes se centrifugó a 3000xg durante 10 minutos para la separación del suero. El suero se conservó a -20° C hasta su análisis.

3.3. Detección de *P.aeruginosa* por PCR en tiempo real.

Se han utilizado cuatro secuencias genéticas ya publicadas previamente para la identificación de *P.aeruginosa* pertenecientes a los genes *oprI* (OPR), *algD* (VIC), *toxA* (ETA) y *gyrB* (Subunidad B de la DNA girasa).

Los cebadores liofilizados se rehidrataron en H₂O a una concentración inicial de 100µM según la información aportada por el fabricante. A partir de ella se prepara la solución de trabajo de concentración 10 µM.

Los cebadores utilizados y el tamaño teórico del amplicón generado aparecen en la Tabla-3.3.1 junto con la temperatura de hibridación utilizada en la PCR.

Tabla 3.3.1. Características de la PCR en tiempo real utilizada para la detección de *P.aeruginosa*

Gen diana	Cebadores utilizados	Tamaño teórico amplicón	Temperatura hibridación cebadores
<i>oprI</i> (OPR)	OPR-1 GCT CTG GCT CTG GCT GCT OPR-2 AGG GCA CGC TCG TTA GCC	330 pb	58°C
<i>algD</i> (VIC)	VIC-1 TTC CCT CGC AGA GAA AAC ATC VIC-2 CCT GGT TGA TCA GGT CGA TCT	520 pb	58°C
<i>toxA</i>	ETA-1 GAC AAC GCC CTC AGC ATC ACC AGC ETA-2 CGC TGG CCC ATT CGC TCC AGC GCT	367 pb	68°C
<i>gyrB</i>	gyrPA-398 CCT GAC CAT CCG TCG CCA CAA C gyrPA-620 CGC AGC AGG ATG CCG ACG CC	222 pb	68°C

Para la reacción de PCR se utilizó el reactivo Quantitect[®] SYBR[®] Green PCR de Qiagen que contiene los componentes que se indican en la tabla 3.3.2

Tabla-3.3.2. Composición reactivo Quantitect[®] SYBR[®] Green PCR

Reactivo	Componente
2x Quantitect SYBR [®] Green PCR master mix	-HotStar Taq DNA polymerase -QuantiTectSYBR Green PCR Buffer (Tris-Cl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5mM MgCl ₂ , pH 8,7) -dNTP mix -SYBR Green I and ROX
RNase-free water	H ₂ O ultra pura para PCR

La reacción de PCR se realizó en un termociclador de tiempo real SmartCycler de la marca Cepheid siguiendo el protocolo que se indica en la Tabla-3.3.3 con la única diferencia que para los pares de cebadores OPR-1/OPR-2 y VIC-1/VIC-2 se utilizó una temperatura de hibridación de 58° C y para ETA-1/ETA-2 y GyrPA-398/GyrPA-620 se utilizó la de 68° C. El protocolo incluye la identificación de los productos de amplificación mediante el análisis de las curvas de disociación del DNA para el cálculo de la temperatura de fusión.

Tabla-3.3.3. Protocolos de amplificación para la PCR en tiempo real

Nº Ciclos	Tiempo	Temperatura	Captura fluorescencia
1	900 s	95° C (activación)	NO
40	30s	94° C (desnaturalización)	NO
	30s	58° C ¹ / 68° C ² (hibridación)	NO
	30s	72° C (extensión)	SI
1	300	72° C (extensión)	NO
1	0,1° C /segundo 65-95° C (Análisis de la curva de disociación del DNA)		NO

¹ 58°C para OPR1/OPR2 y VIC1/VIC2

² 68°C ETA-1/ETA-2 y GyrPA-398/GyrPA-620

La mezcla de reacción se preparó según se indica en la Tabla-3.3.4 para un volumen final de 25 µl por reacción, añadiendo a los 20 µl de mezcla de reacción 5 µl de la muestra extraída.

Tabla-3.3.4. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR en tiempo real

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración Final	Volumen 1 tubo	Volumen 16 tubos
2x Quantitect SYBR Green PCR master mix	2x	1x	12,5 µl	200 µl
Cebador 5'	10 µM	0,5 µM	1,25 µl	20 µl
Cebador 3'	10 µM	0,5 µM	1,25 µl	20 µl
RNase-free water	-	-	5 µl	80 µl
TOTAL	-	-	20µl	20µl/ tubo

El tamaño de los amplicones generados en las técnicas de PCR, se estimó mediante el sistema MCE-202 MultiNA (Shimadzu Corporation, Japan) de electroforesis capilar, utilizando el reactivo para análisis de DNA de tamaño comprendido entre 100 y 1000 pares de bases (pb).

3.4. Preparación de estándares para la PCR cuantitativa en tiempo real

Para realizar las técnicas de PCR de forma cuantitativa se prepararon estándares con un número conocido de UFC de *P.aeruginosa*/ml. Para ello, colonias de *P aeruginosa* aisladas por cultivo de 24 horas en agar McConkey se resuspendieron en 1 ml de suero fisiológico estéril y se diluyeron hasta obtener una concentración McFarland de 0,5 (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Se realizaron diluciones seriadas en suero fisiológico estéril 1/10 a 1/10⁹ para comprobar el recuento real. Como inóculo, 10 µl de cada dilución se sembraron, por triplicado, en agar Mac Conkey. Las placas se incubaron durante una noche a 37° C y las colonias se contaron para estimar el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en cada dilución.

Los estándares se trataron igual que las suspensiones de los exudados faríngeos de los pacientes y se realizó extracción de ácidos nucleicos a partir de 0,5 ml de suspensión y elución en 25 µl. En la Tabla- 3.4.1 se detallan los estándares preparados y su concentración expresada en UFC/ml y en el correspondiente logaritmo.

Tabla-3.4.1. Estándares de *P.aeruginosa* usados en las técnicas de PCR

Nº estándar	DILUCION	NºUFC/ml	Log ₁₀ NºUFC/ml
8	1 (McFarland=0,5) ¹	0,5-1x10 ⁸	8
7	10 ⁻¹	0,5-1x10 ⁷	7
6	10 ⁻²	0,5-1x10 ⁶	6
5	10 ⁻³	0,5-1x10 ⁵	5
4	10 ⁻⁴	0,5-1x10 ⁴	4
3	10 ⁻⁵	0,5-1x10 ³	3
2	10 ⁻⁶	50-100	2
1	10 ⁻⁷	5-10	1
0	10 ⁻⁸	0-1	0
00	10 ⁻⁹	0	0

¹ Para un valor teórico de 0,5 = 1,5X10⁸ UFC/ml

Puesto que las muestras de exudado faríngeo se resuspendieron en 1 ml de suero fisiológico, la concentración de unidades formadoras de colonias /ml se corresponderían con las unidades formadoras de colonias por muestra.

3.5. Detección de anticuerpos anti- *P.aeruginosa* por enzimoimmunoanálisis

Para la detección de anticuerpos IgG anti-*P.aeruginosa* se había utilizado el equipo de reactivos anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA de Mediagnost[®] (Reutlingen, Alemania) distribuido en España por IZASA (referencia 569E15). El equipo contiene 3 placas de 96 pocillos recubiertos con uno de los tres antígenos elastasa (ELA), proteasa alcalina (PA) y exotoxina A (ETA) de *P. aeruginosa*. Las muestras de suero se ensayaron a la dilución 1/100 y 1/1000. Las muestras de suero con títulos > 1/3500 se ensayaron a la dilución 1/10000.

El manual de la técnica define los títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1/1250 como positivos para el diagnóstico de la colonización crónica. Contempla también una zona gris o positiva límite para los títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1/500 pero inferiores a 1/1250. Para el cálculo del título de anticuerpos de los sueros, se incluyeron en cada ensayo: tres sueros controles positivos (PK), cada uno de ellos reactivo frente a uno de los tres antígenos, con un título de 1/2500 (factor de titulación 2,5); un suero control (KS), reactivo

frente a los tres antígenos, con un título de 1/1000 (factor de titulación 1,0) y un control negativo (NK) no reactivo frente a los tres antígenos (factor de titulación 0,0), todos ellos facilitados por el fabricante.

Para la realización del EIA se utilizaron los reactivos, así como el material y aparatos adicionales y el protocolo que se detallan a continuación:

Reactivos

1. Tres placas de 96 pocillos, cada una de ellas recubierta con uno de los tres antígenos analizados, Proteasa alcalina (PA, roja), elastasa (ELA, azul) y exotoxina A (ETA, verde).
2. Conjugado: anti-IgG humana conjugada con peroxidasa. Usar diluido 1/100 con tampón de dilución.
3. Tres controles positivos, cada uno de ellos reactivo frente a uno de los tres antígenos con un título de 1/2.500 (factor de titulación = 2,5)
4. Suero control, reactivo frente a cada uno de los tres antígenos con un título de 1/1000 (factor de titulación = 1,0)
5. Suero control negativo, no reactivo frente a ninguno antígenos (factor de titulación =0,0)
6. Tampón de dilución (PBS).
7. Tampón de lavado. Para utilizar diluido 1/20 con agua destilada.
8. Substrato (TMB).
9. Solución de parada (0,2 M H₂SO₄).

Material y equipo adicional

1. Agua destilada.
2. Incubador de 37° C.
3. Pipetas con puntas desechables.
4. Espectrofotómetro (Microplate reader 2001 (Whittaker[®]) con filtro de 450nm.

Procedimiento operativo

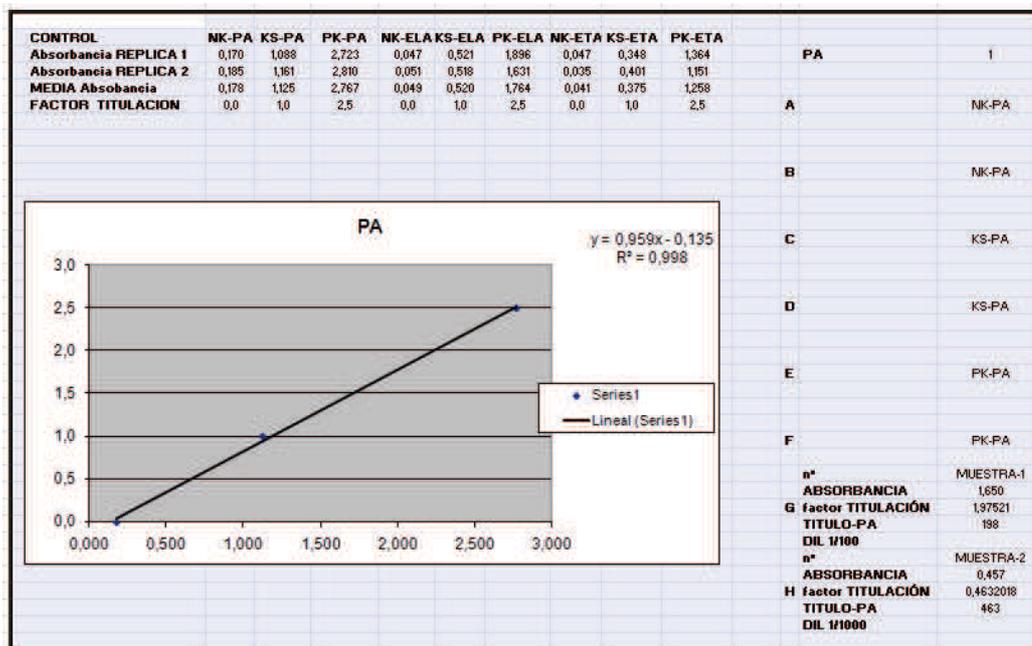
1. Se incluyeron en cada ensayo y para cada antígeno el control positivo, el suero control y el control negativo. Se ensayaron por duplicado añadiendo 100 µl de cada uno.
2. Se incluyeron en cada ensayo y para cada antígeno cada uno de los sueros a las diluciones 1/100 y 1/1.000. La dilución 1/10.000 se ensayó únicamente en sueros con títulos superiores a 1/3500.

3. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37° C.
4. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl de tampón de lavado diluido.
5. Se añadieron 100 µl de conjugado diluido en cada pocillo.
6. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37° C.
7. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl de tampón de lavado diluido
8. Se añadieron 100 µl de sustrato (TMB) en cada pocillo
9. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
10. Se añadieron 100 µl de solución de parada.
11. La lectura de en el las placas se realizó espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm con referencia a 690 nm, antes de que transcurrieran 30 minutos.

Calculo del título de anticuerpos.

Para el cálculo del título de anticuerpos se construyó una recta de calibración (recta de regresión lineal) con los tres controles de título conocido utilizando el programa Excel

Figura-3.5.1. Archivo Excel para el cálculo del título de anticuerpos



La media de absorbancia de los controles se situó en el eje de las abscisas (x) y el correspondiente factor de titulación para cada control en el eje de las ordenadas (y). De esta forma se obtuvo la ecuación de la recta de regresión correspondiente a cada ensayo. Con ella se

pudo obtener el factor de titulación de cada muestra a partir de la absorbancia obtenida en el ensayo. El título final se calculó multiplicando el factor de titulación obtenido por la dilución a la que se había ensayado la muestra. Los ensayos con un coeficiente de regresión (R^2) inferior a 0,90 se repitieron. En la Figura 3.7.1 se muestra un ejemplo de los cálculos en Excel para uno de los ensayos realizados.

3.6. Análisis estadístico

En el **análisis descriptivo** del estudio se compararon las variables cualitativas en valores absolutos y los correspondientes porcentajes. Las variables cuantitativas por su media y la desviación estándar o por la mediana y los cuartiles uno (percentil 25%) y tres (percentil 75%) cuando no se alcanzaron los criterios de normalidad.

En el **análisis Inferencial** se usaron las pruebas del chi cuadrado de Pearson's o la prueba exacta de Fisher en la comparación de las variables cualitativas. Se ha utilizado la prueba t de Student en el estudio de variables cuantitativas entre dos grupos, o la prueba de la U de Mann-Whitney cuando no se alcanzaron los criterios de normalidad. En la comparación entre tres o más grupos, se utilizó el análisis de la varianza o la prueba de Kruskal-Wallis cuando no se alcanzaron los criterios de normalidad. El nivel de significación estadística aplicada en todos los casos ha sido $\alpha \leq 0,05$. El estudio estadístico se realizó mediante el programa SPSS Statistics 17.0 para Windows.

Se seleccionaron como puntos de corte óptimos los de mayor poder discriminatorio, calculados mediante curvas ROC. Los resultados de la técnica de enzaimmunoensayo (EIA) utilizada para la determinación de los títulos de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* y de la PCR cuantitativa se han valorado mediante la sensibilidad (S), la especificidad (E), la exactitud (Ex), y el área bajo la curva ROC que valora la capacidad diagnóstica de un test. Para interpretar las curvas ROC se han utilizado los siguientes intervalos para los valores del área bajo la curva (AUC): Test malo de 0,5 a 0,59; Test regular de 0,6 a 0,74; Test bueno de 0,75-0,89; Test muy bueno de 0,90 a 0,96 y test excelente de 0,97 a 1. Se han calculado también los valores predictivo positivo (VPP) y negativo (VPP) de las técnicas para el diagnóstico de la colonización tanto actual como crónica.

4. RESULTADOS

4.1. Selección de las técnicas de PCR

Para seleccionar la técnica de PCR más idónea se ha tenido en cuenta la sensibilidad de las técnicas para detectar *P.aeruginosa* usando colonias aisladas a partir de muestras clínicas, así como las características de la PCR y del amplicón obtenido.

Para estimar el número mínimo de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de *P.aeruginosa* necesario para dar una señal positiva en las técnicas de PCR se han utilizado los estándares preparados según se ha expuesto en material y métodos, a partir de colonias de *P.aeruginosa* aisladas por cultivo. Para cada dilución se realizó extracción de ácidos nucleicos a partir de un volumen de 0,5 ml y se eluyó en 25 µl. La PCR en tiempo real se realizó con 5 µl de eluido en las mismas condiciones descritas para las muestras. En la Tabla-4.1.1 se muestran los resultados obtenidos con cada una de las secuencias ensayadas.

Tabla-4.1.1. Resultados obtenidos con cada uno de las secuencias ensayadas.

N° estándar ¹	DILUCION	N°UFC/ml	Log ₁₀ N°UFC/ml	Ciclo umbral (CT) ² medio			
				<i>oprI</i>	<i>algD</i>	<i>ToxA</i>	<i>gyrB</i>
8	1	0,5-1x10 ⁸	8	15,10	35,50	12,49	13,88
7	10 ⁻¹	0,5-1x10 ⁷	7	17,87	N	15,61	16,26
6	10 ⁻²	0,5-1x10 ⁶	6	21,50	N	18,57	21,65
5	10 ⁻³	0,5-1x10 ⁵	5	23,86	N	22,05	24,04
4	10 ⁻⁴	0,5-1x10 ⁴	4	29,58	N	25,61	26,76
3	10 ⁻⁵	0,5-1x10 ³	3	32,91	N	28,67	30,15
2	10 ⁻⁶	50-100	2	36,52	N	32,43	34,24
1	10 ⁻⁷	5-10	1	N	N	34,20	38,67
0	10 ⁻⁸	0-1	0	N	N	N	N
00	10 ⁻⁹	0	0	N	N	N	N

¹Preparados según se ha expuesto en material y métodos

² ciclo umbral (CT=*Cycle Threshold*) = primer ciclo que sobrepasa el umbral de detección de fluorescencia y por tanto, en el que se considera positiva la prueba.

El tamaño de los amplicones obtenidos mediante PCR en tiempo real para las secuencias ensayadas se determinó mediante electroforesis capilar, Figura-4.1.1.

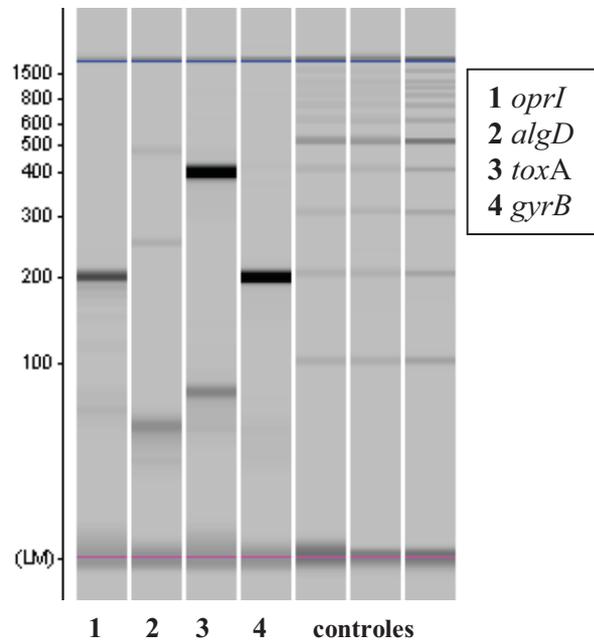


Figura-4.1.1. Tamaño de los amplicones determinado por electroforesis capilar

La temperatura de fusión específica de cada amplicón se obtuvo mediante la curva de disociación del DNA amplificado realizada al final del protocolo de cada PCR. Los valores promedio de tamaño y temperatura de fusión específicos de cada amplicón se exponen en la Tabla-4.1.2.

Tabla-4.1.2. Características del amplicón obtenido con cada una de las secuencias

Gen diana	Temperatura hibridación cebadores	Tamaño teórico	Tamaño medio experimental ¹	Temperatura de fusión media ²
<i>oprI</i>	58°C	330 pb	190 pb	87,2 (87,59-87,99 / 0,218)
<i>algD</i>	58°C	520 pb	245 pb + 465 pb	-
<i>toxA</i>	68°C	367 pb	390 pb	89,5 (88,92-89,99 / 0,359)
<i>gyrB</i>	68°C	222 pb	200 pb	87,0 (86,68-87,38 / 0,213/)

¹ Obtenido mediante electroforesis capilar

² Obtenidas mediante curvas de disociación del DNA amplificado realizadas al final del protocolo de PCR. Promedio (rango/desviación estándar)

Se descartó la utilización de la secuencia del gen *algD* por tener muy poca sensibilidad en la PCR en tiempo real, ya que solo amplificó la primera dilución, correspondiente a 10^8 UFC/ml. El mal resultado se confirmó por electroforesis capilar, ya que en ésta se observaron dos bandas de poca intensidad de 245 y 465 pb en vez de un único amplicón con un tamaño teórico esperado de 520 pb.

Las secuencias *oprI*, *toxA* y *gyrB*, presentan un límite de detección inferior similar de 10 UFC/ml para las dos últimas y de 100 UFC/ml para *oprI*. En el caso de la secuencia *oprI* se obtiene un amplicón de tamaño menor al teórico esperado, por lo que también se descartó. En el caso de las secuencias *toxA* y *gyrB* el tamaño medio de los amplicones obtenidos era similar al teórico esperado. En ambos casos, las rectas estándares obtenidas tienen coeficientes de correlación lineal muy buenos, superiores a 0,99 (Figura-4.1.2).

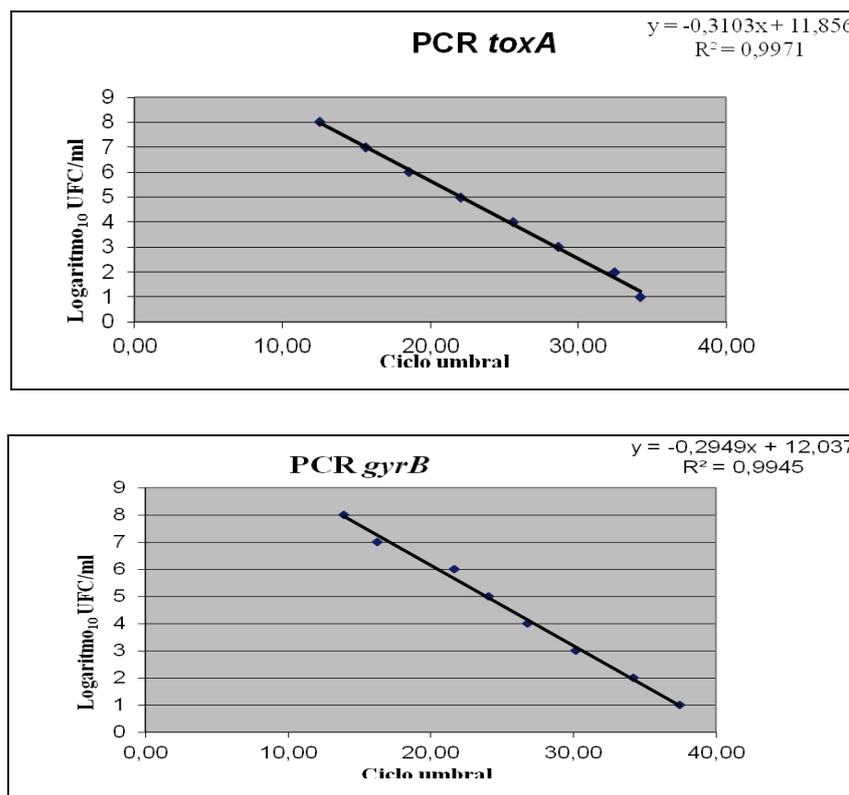


Figura-4.1.2. Rectas estándar para *toxA* y *gyrB*. En abscisas se representa el ciclo umbral (CT=*Cycle Threshold*) = primer ciclo que sobrepasa el umbral de detección de fluorescencia y por tanto, en el que se considera positiva la prueba y en ordenadas el logaritmo del n° de UFC/ml.

Finalmente para escoger la técnica más idónea entre las dos que presentaban las mejores características, se determinó la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas para detectar *P.aeruginosa* en muestras de frotis faríngeo de pacientes atendidos en la unidad de FQ y remitidas al servicio de Microbiología para cultivo convencional. Las muestras se recogieron secuencialmente y los escobillones una vez procesados para cultivo se resuspendieron en 1 ml de suero fisiológico estéril como se describe en material y métodos y se realizó la PCR en tiempo real para detectar las secuencias *toxA* y *gyrB* de *P.aeruginosa*.

Se analizaron un total de 122 muestras, 16 (13,1%) con cultivo positivo (8 con aislamiento escaso) a *P.aeruginosa*, 40 con cultivo positivo a otros patógenos y 66 con cultivo negativo. Se recogió el resultado del cultivo convencional así como el tiempo transcurrido desde el último cultivo positivo a *P.aeruginosa*. En la Tabla-4.1.3 se detalla la distribución de las muestras según el resultado del cultivo convencional. El microorganismo más frecuente fue *S.aureus* y se aisló en el 22,1% de las muestras. Otros bacilos Gram negativos, tanto fermentadores como no fermentadores, se aislaron en un 15,6%. Los cultivos positivos a *P.aeruginosa* fueron todos monomicrobianos, mientras que entre los positivos a otros microorganismos, el 30% (12 muestras) fueron polimicrobianos.

Tabla-4.1.3. Distribución de las muestras según el resultado del cultivo convencional

<i>Cultivo P.aeruginosa</i>	<i>Cultivo positivo otros microorganismos¹</i>			<i>Ultimo cultivo positivo a P.aeruginosa</i>		
	<i>Sa</i>	<i>BGN</i>	<i>BGNNF</i>	<i>Nunca</i>	<i><1 año</i>	<i>>1 año</i>
POSITIVO (n =16)	0	0	0	0	14(87,5)	2(12,5)
NEGATIVO (n = 40)	27 (67,5) ²	11 (27,5) ³	8 (20,0) ⁴	14(35,0)	12(30,0)	14(35,0)
NEGATIVO (n = 66)	0	0	0	15(22,7)	24(36,4)	27(40,9)
TOTAL (n= 122)	27 (22,1%)²	11 (9,0)³	8 (6,6)⁴	29(23,8)	50(41,0)	43(35,2)

¹ Sa= *S.aureus*, BGN=Bacilo Gram negativo, BGNNF= bacilo gran negativo no fermentador N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo).

²Cultivo mixto 3 muestras. ³Cultivo mixto 4 muestras. ⁴cultivo mixto 5 muestras

La PCR fue positiva en 19 muestras para la secuencia *gyrB* y en 11 muestras para la secuencia *toxA*. En 16 muestras se obtuvo un resultado positivo por cultivo. En otras 6 muestras con cultivo negativo para *P.aeruginosa*, se obtuvo un resultado positivo con una o ambas técnicas de PCR.

Tabla-4.1.4. Resultado de las técnicas de PCR respecto al cultivo

<i>Cultivo P.aeruginosa</i>	<i>PCR gyrB positiva</i>	<i>PCR toxA positiva</i>	<i>Cultivo y/o PCR gyrB y/o PCR toxA positivos</i>
<i>Positivo (n = 16)</i>	14(87,5%)	7(43,8%)	16 (100%)
<i>Negativo con otros microorganismos (n = 40)</i>	2(5,0%)	2(5,0%)	2 (5,0 %)
<i>Negativo sin otros microorganismos (n = 66)</i>	3(4,5%)	2(3,0%)	4 (6,1%)
TOTAL (n= 122)	19(15,6%)	11(9,0%)	22 (18,0%)

*Nº muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

En las muestras positivas por PCR se calculó el n° de UFC/ml utilizando la recta estándar para cada una de las secuencias. En la Tabla-4.1.4 se muestran los resultados obtenidos con las 22 muestras en las que se obtuvo algún resultado positivo, ya fuera de cultivo o de PCR.

Tabla-4.1.4. Características de las muestras con resultado positivo por cultivo o PCR

	<i>Cultivo</i>	<i>Cuantitativo ¹</i>	<i>PCR gyrB²</i>	<i>PCR toxA³</i>	<i>Ultimo cultivo+ a P.aeruginosa</i>
1	<i>P.aeruginosa</i>	++	0	712	>1 año
2	<i>P.aeruginosa</i>	+	23	0	1mes
3	<i>P.aeruginosa</i>	++	305999	103768	1mes
4	<i>P.aeruginosa</i>	++	22834	275635	1mes
5	<i>P.aeruginosa</i>	+	7128	2656	1mes
6	<i>P.aeruginosa</i>	+	34	0	10 meses
7	<i>P.aeruginosa</i>	+	521	0	8 meses
8	<i>P.aeruginosa</i>	++	11671	4721	2 meses
9	<i>P.aeruginosa</i>	++	131	0	5 meses
10	<i>P.aeruginosa</i>	+	76	0	2 meses
11	<i>P.aeruginosa</i>	++	131	0	2 meses
12	<i>P.aeruginosa</i>	++	1716	737	3 meses
13	<i>P.aeruginosa</i>	+	35	0	2 meses
14	<i>P.aeruginosa</i>	++	4444	1414	3 meses
15	<i>P.aeruginosa</i>	+	26	0	2 meses
16	<i>P.aeruginosa</i>	+	0	0	1 mes
17	<i>S.aureus</i>	-	24	84	6 meses
18	<i>BGN+ BGNNF</i>	-	228	30	>1 año
19	<i>Negativo</i>	-	2351	629	3 meses
20	<i>Negativo</i>	-	25	0	2 meses
21	<i>Negativo</i>	-	0	19	2 meses
22	<i>Negativo</i>	-	26	0	2 meses

¹ + Escasas colonias, ++ bastantes colonias

² UFC/ml

Respecto a los resultados del cultivo, la PCR $gyrB$ tuvo una sensibilidad del 87,5% y una especificidad 95,3% mientras que con la PCR $toxA$ la sensibilidad se redujo al 43,8% pero con una especificidad del 96,2%.

Si se tienen en cuenta los resultados de cultivo y PCR conjuntamente y se incluyen como verdaderos positivos las muestras con dos resultados positivos, el número de muestras positivas para *P.aeruginosa* son 18. Los resultados se muestran en la Tabla-4.1.6.

Tabla-4.1.6. Clasificación de las muestras con resultado positivo de *P.aeruginosa**

<i>P.aeruginosa</i> ¹	Cultivo positivo ²	PCR <i>gyrB</i> positiva ²	PCR <i>toxA</i> positiva ²
Positivas (n = 18)	15 (83,3%)	17(94,4%%)	10(55,6%)
Negativas (n = 104)	1(0,96%)	2(1,9%)	1(0,96%)
TOTAL (n= 122)	16 (13.1%)	19(15,6%)	11(9,0%)

¹ Muestras con cultivo positivo y/o las dos PCR positivas

² N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

Teniendo en cuenta estos resultados, los valores de sensibilidad para cultivo, PCR *gyrB* y *toxA* serían de 83,3%, 94,4% y 55,6%, respectivamente. De la misma manera, los valores de especificidad serían de 99,0% para cultivo y PCR *toxA* y del 98,1% para PCR *gyrB*. Aunque los mejores resultados se obtuvieron con la PCR *gyrB*, la técnica de PCR *toxA* permite confirmar tres resultados positivos obtenidos por la técnica PCR *gyrB* con cultivo negativo, por lo que se decidió utilizar estas dos técnicas de PCR.

4.2. Análisis de las muestras de pacientes estables microbiológicamente

En el estudio para seleccionar los puntos de corte óptimos, tanto de las pruebas serológicas como moleculares, se han incluido 116 muestras de otros tantos pacientes en situación estable microbiológicamente respecto a la infección por *P.aeruginosa*. Se ha definido como situación estable microbiológicamente, el que no hubiera cambiado el estatus de colonización entre un año antes y un año después de la obtención de las muestras. De cada uno de los casos se ha incluido la primera muestra de suero y exudado faríngeo en las que se cumplía esta condición.

4.2.1. Características de los grupos analizados

Para cada una de las 116 pares de muestras de suero y exudado faríngeo incluidas se ha recogido el resultado del seguimiento microbiológico habitual, durante el año previo y posterior a su obtención, además de los antecedentes de colonización durante al menos los 10 años previos. Esta información se ha utilizado para definir el estatus de colonización según los criterios descritos en material y métodos. Las muestras se dividieron en cinco grupos: Grupo 1 con 24 muestras (20,7%) de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo 2 con 27 muestras (23,3%) de pacientes no colonizados por *P. aeruginosa* durante el año anterior y posterior a la obtención de las muestras pero con algún periodo de colonización inicial (14 con solo un episodio de colonización inicial y 13 con más de un episodio de colonización inicial); Grupo 3 con 22 muestras de pacientes (19,0%) sin colonización actual pero con algún periodo previo de colonización intermitente (20 casos) o colonización crónica (2 casos); Grupo 4 con 26 muestras de pacientes (22,2%) con colonización intermitente por *P.aeruginosa* durante los 12 meses anteriores y posteriores (17 con algún periodo previo de colonización intermitente y 8 crónica y 1 inicial) y Grupo 5 con 17 muestras de pacientes con colonización crónica por *P.aeruginosa* durante el año anterior y posterior (1 con algún periodo de colonización previa intermitente y 16 crónica). Los antecedentes de colonización previa se representan en la Figura-4.2.1.1. La prevalencia de colonización por *P.aeruginosa* fue del 37,1%, mientras que la de colonización crónica fue del 14,7%.

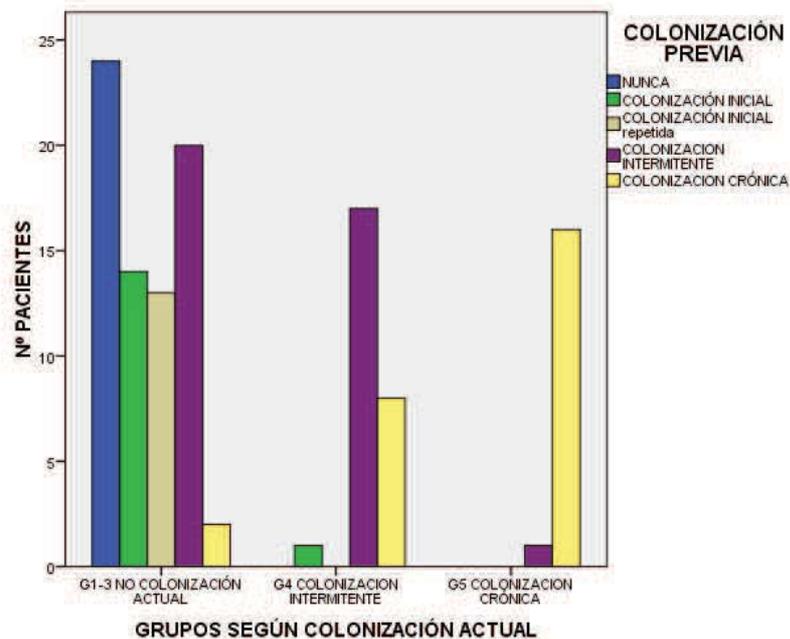


Figura-4.2.1.1. Distribución de los antecedentes de colonización previa por *P.aeruginosa* en cada uno de los grupos del estudio. Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica.

También se ha recogido el total de muestras estudiadas en el seguimiento microbiológico habitual realizado durante el año anterior y posterior a la obtención de las muestras de suero y exudado faríngeo incluidas en el estudio, así como del número de muestras positivas a *P.aeruginosa*. El resultado de estas muestras se utilizó para definir el estatus de colonización.

Respecto a la distribución por grupos tanto del total de muestras analizadas como del número de muestras positivas a *P.aeruginosa* en este periodo de dos años, se encontraron diferencias significativas entre el Grupo 1 y Grupo 2 con respecto a los Grupos 3, 4 y 5 ($p < 0,01$), pero no entre estos tres últimos entre sí. Como era de esperar, solo hay diferencias significativas en cuanto al número de muestras positivas entre los grupos 4 y 5 ($p < 0,001$) respecto a los grupos 1, 2 y 3. Los resultados se detallan en la Tabla-4.2.1.1 y Figura-4.2.1.2.

Tabla-4.2.1.1. Distribución de la mediana del total de muestras analizadas y positivas a *P.aeruginosa* en el seguimiento microbiológico habitual durante el año previo y posterior a la obtención de las muestras.

GRUPOS¹	Nº MUESTRAS²	
	TOTALES	POSITIVAS
Grupo 1 (n = 24)	9 (8/12,75)	0
Grupo 2 (n = 27)	11 (10 /13)	0
Grupo 3 (n = 22)	13,5 (12 /18,25)	0
Grupo 4 (n = 26)	14,5 (12,75 / 17)	4 (2 / 6)
Grupo 5 (n = 17)	15 (12,5 / 29,5)	13 (8,5 /16,5)
TOTAL (n= 116)	13 (10 / 16)	0 (0 /4)

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica

² Mediana del número de muestras (cuartil 1/cuartil 3)

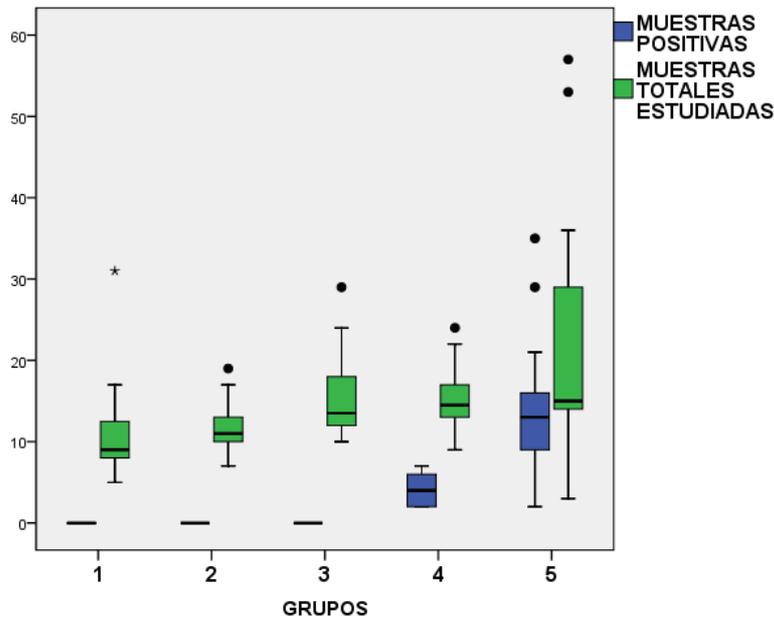


Figura-4.2.1.2. Mediana del total de muestras analizadas y positivas a *P.aeruginosa* para cada uno de los grupos. Los datos corresponden al periodo de 2 años, un año antes y después de la recogida de las muestras de suero y exudado faríngeo, utilizado para definir el estatus de colonización por *P.aeruginosa*. En el gráfico la línea representa el valor de la mediana, el límite superior de la caja corresponde al valor del tercer cuartil (75% de los pacientes) y el límite inferior al primer cuartil (25%); las dos barras verticales determinan el rango del 95% de los casos. Los valores atípicos o extremos están señalados con un punto o asterisco. Grupo-1, 24 pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica.

Se recogió la información del tipo de muestra utilizada principalmente (>50%) en el seguimiento microbiológico habitual durante el periodo comprendido entre el año anterior y posterior a la obtención de las muestras de suero y exudado faríngeo utilizadas en el estudio. La distribución de los grupos según si en el seguimiento se había utilizado principalmente cultivo de esputo o de exudado faríngeo se muestra en la Tabla-4.2.1.2 y Figura-4.2.1.3.

Tabla-4.2.1.2. Distribución del tipo de muestra respiratoria utilizada principalmente en el seguimiento microbiológico habitual para cada grupo

GRUPOS¹	Tipo de muestra²	
	Exudado faríngeo	Esputo
Grupo 1 (n = 24)	21 (87,5)	3(12,5)
Grupo 2 (n = 27)	22 (81,5)	5 (18,5)
Grupo 3 (n = 22)	11 (50)	11 (50)
Grupo 4 (n = 26)	13 (50)	13 (50)
Grupo 5 (n = 17)	5 (29,4)	12 (70,6)
TOTAL (n= 116)	72 (62,1)	44 (41,1)

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica

²Nº casos en los que la muestra utilizada era principalmente exudado faríngeo o esputo (>50%) (Porcentaje respecto al total de cada grupo)

Se encontraron diferencias significativas en el tipo de muestra utilizada en el seguimiento microbiológico habitual inter grupos ($p < 0,001$). Al comparar los grupos individualmente solo se encontraron diferencias significativas al comparar el grupo 1, muestras de pacientes nunca colonizados, y grupo 2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial, con el resto ($p < 0,05$), pero las diferencias no alcanzaron significación estadística al comparar los grupos 1 y 2 entre sí. Tampoco había diferencias significativas al comparar los grupos 3, 4 y 5 entre sí.

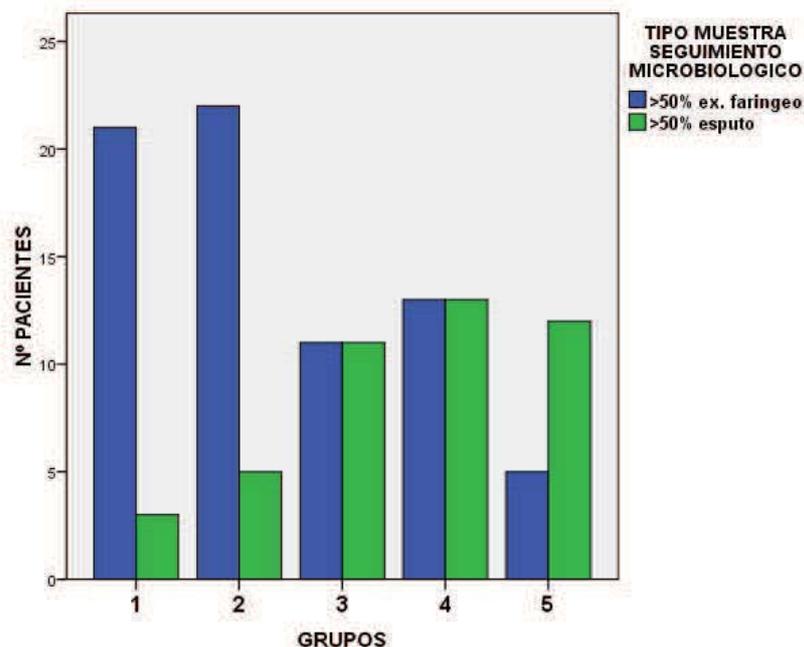


Figura 4.2.1.3. Tipo de muestra analizada en el seguimiento microbiológico habitual realizado durante el periodo de 2 años utilizado para la clasificación microbiológica de los pacientes. Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica.

La distribución por sexo y edad en el momento de la recogida de las muestras de suero y exudado faríngeo para cada uno de los grupos se presenta en la Tabla-4.2.1.3

Tabla-4.2.1.3. Distribución por edad y sexo para cada grupo

GRUPOS ¹	Edad ²	Niñas ³	Niños ³
Grupo 1 (n = 24)	4,24 (0,25 -16,58 / 4,51)	13 (54,2%)	11 (45,8%)
Grupo 2 (n = 27)	7,25 (1,33 -17,75 / 3,91)	9 (33,3%)	18 (66,7%)
Grupo 3 (n = 22)	8,39 (1,58 -16,50 / 4,01)	11 (50%)	11 (50%)
Grupo 4 (n = 26)	10,44 (0,83 -18,33 / 5,40)	14 (53,8%)	12 (46,2%)
Grupo 5 (n = 17)	11,76 (2,08 -17,58 / 4,52)	9 (52,9%)	8 (47,1%)
TOTAL (n= 116)	8,22 (0,25-18,33 / 5,17)	55 (47,4%)	61 (52,6%)

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica

²En años, promedio (rango/desviación estándar)

³ N° casos (porcentaje respecto al total de cada grupo)

Se han incluido 55 muestras de niñas y 61 de niños, con una media de edad de 8,22 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos respecto a la distribución por sexo ($p=0,549$).

Respecto a la edad de los pacientes en el momento de obtención de las muestras, en la Figura-4.2.1.4 se representan la media de edad en cada grupo y las diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas inter grupos ($p<0,001$) aunque en las comparaciones múltiples solo lo fueron entre el grupo-1 de muestras de pacientes nunca colonizados con todos los demás grupos ($p<0,05$). También fueron significativas las diferencias entre el grupo-2 de muestras de pacientes no colonizados pero con antecedentes de colonización inicial y los grupos 4 ($p<0,05$) y 5 ($p<0,01$) y entre el grupo-3 y el grupo 5 ($p<0,05$).

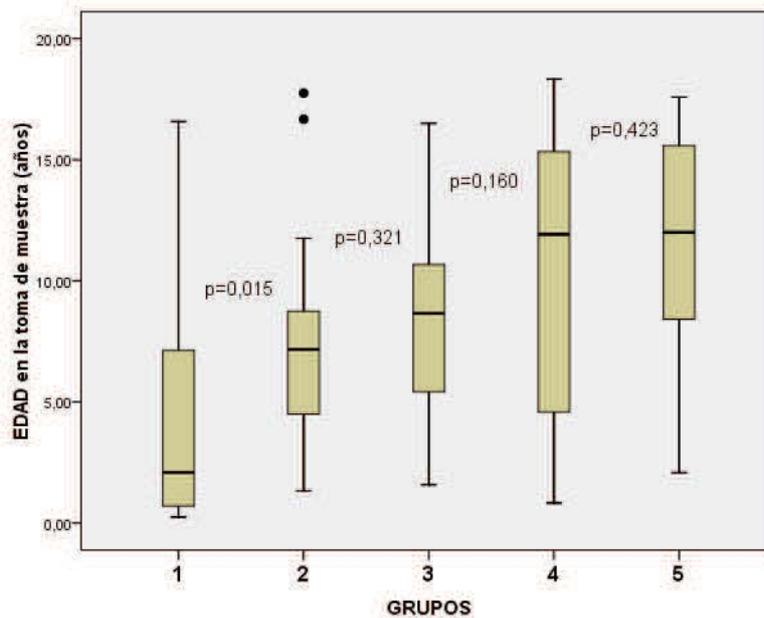


Figura 4.2.1.4. Media de edad en el momento de obtención de las muestras para cada uno de los grupos del estudio. En el gráfico la línea representa el valor de la mediana, el límite superior de la caja corresponde al valor del tercer cuartil (75% de los datos) y el límite inferior al primer cuartil (25%); las dos barras verticales determinan el rango del 95% de los casos. Los resultados atípicos están señalados por un punto Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica. Se muestra la significación estadística entre grupos.

La distribución según la edad a la que se realizó el diagnóstico de FQ en cada uno de los grupos se muestra en la Tabla-4.2.1.4. Se muestra el número de casos de cada grupo clasificados en tres categorías según que el diagnóstico de FQ se hubiera realizado precozmente antes del primer año de vida, entre 1 y 2 años o más tardíamente a edades superiores a los dos años. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos al comparar los diagnosticados antes o después del año de vida ni al agruparlos en las tres categorías.

Tabla-4.2.1.4. Distribución por edad de diagnóstico de la FQ para cada grupo

GRUPOS¹	Edad de diagnóstico FQ			
	Mediana²	<1año³	1-2 años³	>2 años³
Grupo 1 (n = 24)	2,0 (1/6,5)	19 (79,2%)	3 (12,5%)	2 (8,3%)
Grupo 2 (n = 27)	2,0 (1 /6,0)	24 (88,9%)	1 (3,7%)	2 (7,4%)
Grupo 3 (n = 22)	3,5 (1 /12,5)	17 (77,3%)	2 (9,1%)	3 (13,6%)
Grupo 4 (n = 26)	4,5 (1 / 25,5)	17 (65,4%)	3 (11,5%)	6 (23,1%)
Grupo 5 (n = 17)	5 (2 / 30,5)	10 (58,8%)	2 (11,8%)	5 (29,4%)
TOTAL (n= 116)	3 (1 /12,25)	87 (75,0%)	11 (9,5%)	18 (15,5%)

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica

² En meses, mediana (cuartil 1/cuartil 3)

³ N° casos (porcentaje respecto al total de cada grupo)

Respecto a las mutaciones del gen de la CFTR, el 81% de los 116 casos presentaban la delección en la posición F508 en al menos uno de los dos alelos, siendo el 26,7% homocigotos y 54,3% heterocigotos con respecto al total de pacientes del estudio. El 18,9% de los pacientes no presentaban esta mutación en ninguno de los dos alelos, siendo la mayoría (15,5%) heterocigotos para otras mutaciones. Existían diferencias estadísticamente significativas al comparar el porcentaje de homocigotos para F508del ($p=0,034$), si bien en el análisis dos a dos únicamente lo fueron entre el grupo 1 y los grupos 4 y 5.

Del total de casos incluidos, 110 (94,8%) tenían una FQ confirmada por la presencia de 2 mutaciones causantes de FQ, teniendo en cuenta la información disponible en la *Cystic Fibrosis Mutations Database* (www.cftr2.org/faq.php), y/o test del sudor positivo (superior a 60 mmol/L de ClNa). En 6 casos el test del sudor era indeterminado con valores entre 40 y

59 mmol/L de CINa; uno tenía 2 mutaciones causantes de FQ, 4 casos una mutación causante de FQ acompañada por una mutación de significado incierto y uno era portador de dos mutaciones de significado incierto. Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

Existen diferencias significativas entre los grupos respecto a la presencia de bronquiectasias ($p < 0,001$), aunque cuando se analizan individualmente son significativas entre el grupo 5 (88,2%) y los grupos 1 (16,7%), 2 (25,9%) y 3 (45,5%) pero no con el grupo 4 (65,4%). No existen diferencias significativas entre los grupos en cuanto al índice de masa corporal ajustado por edad y sexo, en el 73,3% era normal. Respecto al valor del volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) en la prueba más cercana a la fecha de la toma de muestra de suero y exudado faríngeo, esta prueba no se había realizado nunca en 38 de los 116 casos por su corta edad. Existen diferencias significativas en cuanto a la realización de la prueba ($p < 0,05$) entre el grupo 1 (33,3%) y los demás grupos pero no de éstos entre sí. La función pulmonar se considera normal cuando el valor del FEV1 es igual o superior al 80% del valor teórico. Se encontraron diferencias significativas entre grupos en el valor de FEV1 inferior al 80% ($p < 0,01$). Ahora bien, al analizar los grupos individualmente solo fueron significativas ($p < 0,01$) las diferencias entre el grupo 5 (76,5%) y los grupos 1 (8,3%), 2 (18,5%), 3 (27,3%) y 4 (23,1%) pero no entre sí. Respecto a la situación clínica general, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) al comparar afectación leve respecto a una mayor afectación ($p < 0,001$). Al comparar los grupos dos a dos las diferencias son estadísticamente significativas entre todos los grupos excepto entre los grupos 1 (91,7%) y 2 (92,6%), grupo 3 (63,6%) y 4 (53,8%) y entre éste último y el grupo 5 (29,4%).

En el 51,7% de casos constaba que habían recibido tratamiento antibiótico con actividad frente a *P.aeruginosa* durante el periodo comprendido entre el año anterior y posterior a la obtención de las muestras de suero y exudado faríngeo. En los grupos 4 y 5 todos habían recibido algún tratamiento antibiótico con actividad frente a *P.aeruginosa*. También lo habían recibido el 16,7% en el grupo 1, el 18,5% en el grupo 2 y el 36,4% en el grupo 3. Cuatro casos, 2 en cada uno de los grupo 2 y 3, habían recibido tratamiento sólo con

azitromicina. Las diferencias sólo fueron significativas ($p < 0.001$) entre los grupos 4 y 5 con los demás grupos.

Entre los tres grupos sin colonización actual por *P.aeruginosa* (grupos 1, 2 y 3), existen diferencias estadísticamente significativas en el número de muestras totales analizadas por cultivo. El grupo 1 se diferencia de los otros dos en la media de edad menor. El grupo 3 se diferencia de los grupos 1 y 2 en un mayor porcentaje de cultivos de esputo y en una peor situación clínica.

Entre el grupo 4, con colonización intermitente por *P.aeruginosa*, y los grupos sin colonización actual (grupos 1, 2 y 3), las diferencias no son significativas en el valor de FEV1 pero sí en el tratamiento antibiótico con actividad frente a *P.aeruginosa* recibido y como es lógico, en el nº de muestras positivas a *P.aeruginosa*. Respecto a las demás variables existen diferencias significativas entre el grupo 4 y el grupo 1 en todas ellas, pero no con el grupo 3. Al contrario que con el grupo 1, las diferencias entre el grupo 2 y 4 no incluyen la presencia de una proporción significativamente mayor de homocigotos para la mutación F508del.

Por el contrario, entre el grupo 5 y los grupos sin colonización actual por *P.aeruginosa* sí son estadísticamente significativas las diferencias en el valor de FEV1. Como es lógico, también son significativas las diferencias en el número de muestras positivas a *P.aeruginosa*. Respecto a las demás variables, existen diferencias significativas entre el grupo 5 y el grupo 1 en todas ellas pero no entre el grupo 5 y el grupo 4. Por el contrario, las diferencias entre el grupo 2 y el 5 no incluyen la presencia de una proporción significativamente mayor de homocigotos para la mutación F508del. Entre el grupo 3 y el grupo 5 tampoco existe significación estadística en la proporción de exudados faríngeos respecto a la de esputos cultivados ni en el número de cultivos totales realizados en el seguimiento microbiológico habitual durante el año anterior y posterior a la fecha de la toma de las muestras analizadas.

4.2.2. Detección del DNA de *P.aeruginosa*. Comparación con el cultivo.

Las 116 muestras de exudado faríngeo se analizaron utilizando las dos técnicas de PCR seleccionadas, según se detalla en el apartado de resultados 4.1, para detectar las secuencias *gyrB* y *toxA* de *P.aeruginosa*. El cultivo convencional que se había realizado simultáneamente fue positivo en 19 de las 43 muestras de pacientes colonizados por *P.aeruginosa*, pertenecientes a los grupos 4 y 5. La PCR para la secuencia *gyrB* fue positiva en 43 muestras, 37 en muestras de pacientes colonizados y 6 en muestras de pacientes no colonizados, 3 del grupo 1, 1 del grupo 2 y 2 del grupo 3. Para la secuencia *toxA* fueron positivas 31 muestras, 2 de ellas en muestras de pacientes no colonizados pertenecientes al grupo 3.

La distribución por grupos de los resultados del cultivo convencional para *P.aeruginosa* realizado simultáneamente a la detección del DNA de la bacteria por PCR se muestra en la Figura-4.2.2.1.

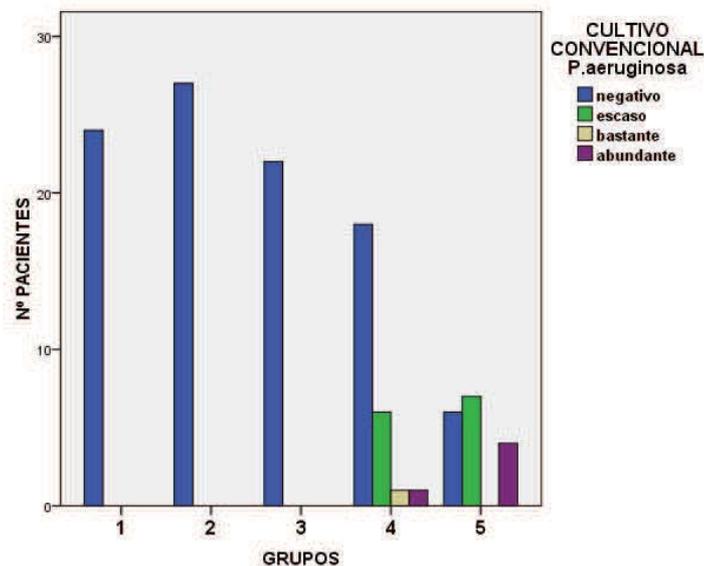


Figura-4.2.2.1. Distribución por grupos del resultado del cultivo convencional para *P. aeruginosa* realizado simultáneamente a la PCR. Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica.

Los resultados obtenidos con el cultivo y cada una de las técnicas de PCR se muestran en la Tabla-4.2.2.1. Las diferencias en el porcentaje de resultados positivos no son significativas entre los grupos 1, 2 y 3 sin colonización actual. Sí lo son con los grupos 4 ($p < 0,01$) y 5 ($p < 0,001$), así como entre estos dos últimos entre sí ($p < 0,05$).

Tabla-4.2.2.1. Resultados de cultivo y PCR en cada uno de los grupos analizados

GRUPOS¹	Cultivo <i>P.aeruginosa</i>		PCR <i>gyrB</i>	PCR <i>ToxA</i>	PCR <i>gyrB</i> + PCR <i>ToxA</i> Positivas y/o Cultivo positivo²
	Negativo	Positivo	Positiva	Positiva	
Grupo 1 (n = 24)	24(100)	-	3(12,5)	0	0
Grupo 2 (n = 27)	27(100)	-	1(3,7)	0	0
Grupo 3 (n = 22)	22(100)	-	2(9,1)	2(9,1)	2(9,1)
Grupo 4 (n = 26)	18(69,2)	-	12(46,1)	7(26,9)	7(26,9)
	-	8(30,8)	8(30,8)	6(23,1)	8(30,8)
Grupo 5 (n = 17)	6(35,3)	-	6(35,3)	5(29,4)	5(29,4)
	-	11(64,7)	11(64,7)	11(64,7)	11(64,7)
TOTAL (n= 116)	97 (83,6)	19(16,4)	43(37,1)	31(26,7)	33(28,4)

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica

²Nº muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

Si se tienen en cuenta los resultados de cultivo y PCR conjuntamente y se consideran también positivas las muestras con el cultivo negativo pero con ambas PCR positivas, el número de muestras positivas aumenta desde 19 con cultivo positivo hasta 33 con cultivo positivo y/o detección del DNA de *P.aeruginosa* (PCR *gyrB* y *toxA* positivas simultáneamente). La positividad de ambas PCR permitiría identificar 14 muestras positivas a *P.aeruginosa* adicionales entre las muestras con cultivo negativo, 2 en el grupo 3, 7 en el grupo 4 y 5 en el grupo 5. Los resultados se muestran en la Tabla-4.2.2.2.

Tabla-4.2.2.2. Resultado de las distintas técnicas en las muestras positivas a *P.aeruginosa* corregidas teniendo en cuenta el resultado de cultivo y PCR conjuntamente

Muestras positivas¹	Cultivo positivo²	PCR<i>gyrB</i> positiva²	PCR<i>toxA</i> positiva²
POSITIVAS (n=33)	19(57,6)	33(100)	31(93,9)
NEGATIVAS (n=83)	0(0,0)	10(12,0)	0(0,0)
TOTAL (n=116)	19(16,4)	43(37,1)	31(26,7)
p	<0,001	<0,001	<0,001

¹ Muestras con cultivo positivo y/o las dos PCR positivas

² Nº muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

Si tuviéramos en cuenta estos resultados, los valores de sensibilidad para identificar muestras positivas a *P.aeruginosa* serían del 57,6%, 100% y del 93,9% para cultivo, PCR *gyrB* y PCR *toxA* respectivamente. De la misma manera, los valores de especificidad serían de 100% para cultivo y PCR *toxA* y del 86,7% para PCR *gyrB*. Se encontraron diferencias significativas entre muestras positivas y negativas a *P.aeruginosa* para los resultados de cultivo ($p<0,001$), PCR *gyrB* ($p<0,001$) y PCR *toxA* ($p<0,001$).

Para valorar la capacidad de cada técnica para identificar la colonización por *P.aeruginosa* con los resultados obtenidos con una sola muestra, se han agrupado las muestras de los pacientes no colonizados, grupos 1, 2 y 3, y colonizados, grupos 4 y 5. Se han valorado los resultados cualitativos de cultivo y de ambas técnicas de PCR por separado y combinadas. También se han valorado los resultados sumando al resultado del cultivo el de las dos técnicas de PCR combinadas. Estos datos se muestran en la Tabla-4.2.2.3.

Tabla-4.2.2.3. Resultados obtenidos para el diagnóstico de colonización por *P.aeruginosa* con las distintas técnicas.

<i>Colonización por P.aeruginosa</i> ^{1,2}	<i>Cultivo Positivo</i>	<i>PCR gyrB Positiva</i>	<i>PCR toxA Positiva</i>	<i>PCRgyrB +PCRtoxA Positivas</i>	<i>PCRgyrB + PCRtoxA y/o Cultivo Positivos</i>
No (n=73)	0(0,0)	6 (8,2)	2(2,7)	2(2,7)	2(2,7)
Sí (n=43)	19(44,2)	37(86,0)	29(67,4)	29(67,4)	31(72,1)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	43(37,1)	31(26,7)	31(26,7)	33(28,4)
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹ Sin colonización = grupo 1+2+3; Con colonización =grupo 4+5. Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica

Nº muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

Se encontró asociación entre colonización por *P.aeruginosa* y los resultados de cultivo ($p<0,001$) y de cada una de las PCR tanto individualmente como combinadas entre sí o con el cultivo ($p<0,001$).

Teniendo en cuenta estos resultados, los valores de sensibilidad para identificar colonización por *P.aeruginosa* con los resultados de una sola muestra serían del 44,2% para cultivo, 86,0% para PCR*gyrB* y 67,4% para PCR*toxA*. De la misma manera, los valores de

especificidad serían de 100%, 91,8% y 97,3%, respectivamente. La sensibilidad de las dos técnicas de PCR en conjunto, es decir considerando positivas sólo las muestras con ambas PCR positivas, sería del 67,4 % con una especificidad del 97,3%. Si se tiene en cuenta la exactitud, es decir la capacidad de las técnicas para clasificar correctamente a un paciente con respecto a la colonización por *P.aeruginosa*, el mejor valor (89,7%) se obtiene con la técnica de PCR $gyrB$. Los resultados son algo peores con la PCR $toxA$ sola (86,2%), cuando se combinan PCR $toxA$ y PCR $gyrB$ (86,2%) y cuando se suman el cultivo y los resultados de las dos PCR combinadas (87,9%). Sin embargo en todos casos la exactitud es mejor que cuando se utiliza el resultado del cultivo aislado (79,3%).

En las muestras positivas por PCR se calculó el nº de UFC/ml utilizando la recta estándar para cada una de las secuencias. Los valores de la mediana del número de UFC/ml para cada grupo aparecen en la Tabla-4.2.2.4

Tabla-4.2.2.4. Distribución por grupos de la mediana del número de UFC/ml para cada una de las técnicas de PCR utilizadas

GRUPOS ¹	Nº UFC/ml ²	
	PCR $gyrB$ ³	PCR $toxA$ ³
Grupo 1 (n = 24)	0 (0 / 0)	0 (0 / 0)
Grupo 2 (n = 27)	0 (0 / 0)	0 (0 / 0)
Grupo 3 (n = 22)	0 (0 / 0)	0 (0 / 0)
Grupo 4 (n = 26)	155 (24 / 1165,75)	12,5 (0 / 853,75)
Grupo 5 (n = 17)	13276 (3371,5 / 79316)	3800 (565 / 49050)
TOTAL (n= 116)	0 (0 / 185)	0 (0 / 36,25)

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica

² medianas del número de UFC/ml (percentil 1 y 3) para cada grupo.

En la Figura-4.2.2.2 se representan gráficamente estos datos. En los grupos 1, 2 y 3 los valores de la mediana, así como de los percentiles 25% (cuartil 1) y 75% (cuartil 2) son cero si bien en estos grupos hay 7 casos para PCR $gyrB$ y 2 casos para PCR $toxA$ en los que se obtuvo un resultado positivo y estos casos aparecen marcados como asteriscos. No se encontraron diferencias significativa entre los grupos 1, 2 y 3 para los valores de PCR $gyrB$ y PCR $toxA$ pero sí entre estos grupos y los grupos 4 y 5 y entre éstos dos entre sí ($p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente).

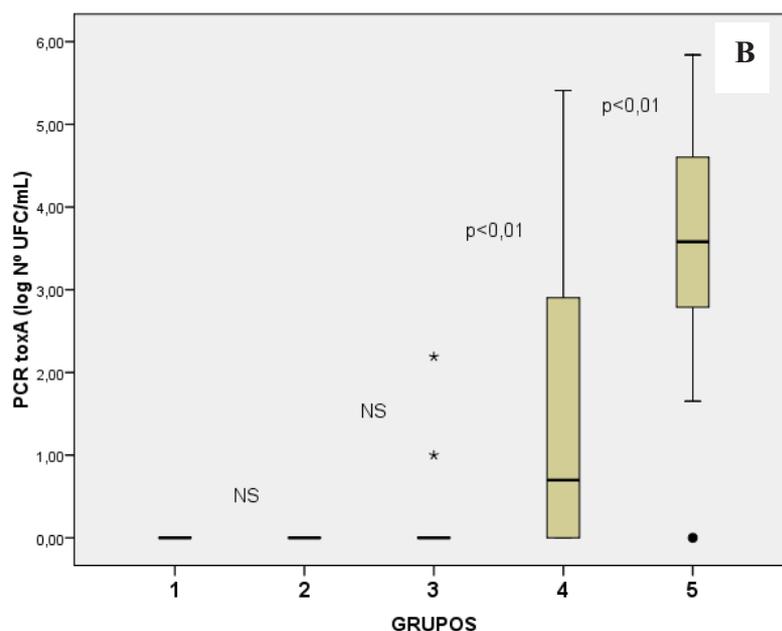
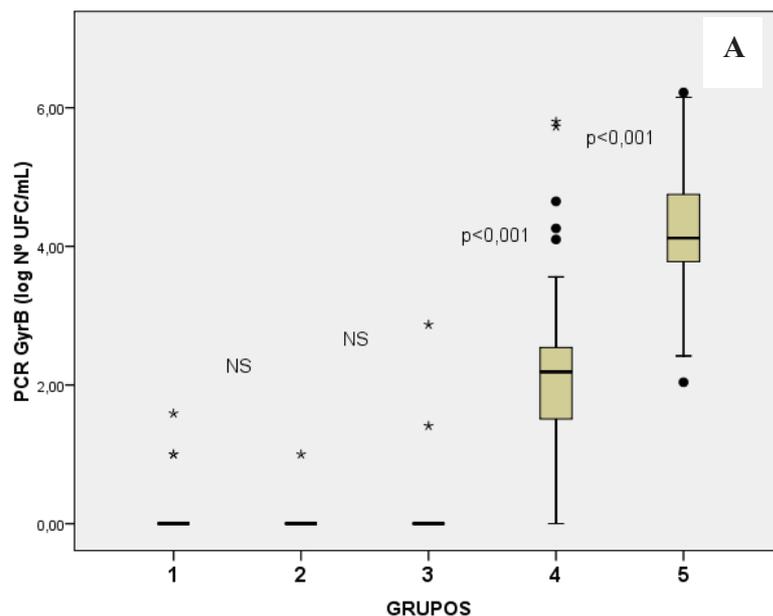


Figura-4.2.2.2. Representación gráfica de la mediana del número de UFC/ml para la PCR *gyrB* (A) para la PCR *toxA* (B) para cada uno de los grupos estudiados. En los gráficos la línea representa el valor de la mediana, el límite superior de la caja corresponde al valor del tercer cuartil (75% de los datos) y el límite inferior al primer cuartil (25%); las dos barras verticales determinan el rango del 95% de los casos. Los valores atípicos se representan con un punto. Los valores extremos están señalados con un asterisco. Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica.

4.2.2.1. Cuantificación del DNA y diagnóstico de colonización

Utilizando el resultado cuantitativo de cada una de las técnicas de PCR, se han calculado mediante curvas ROC los mejores puntos de corte para identificar colonización actual. La representación gráfica de las curvas ROC para las dos pruebas de PCR se muestran en la Figura 4.2.2.1.1.

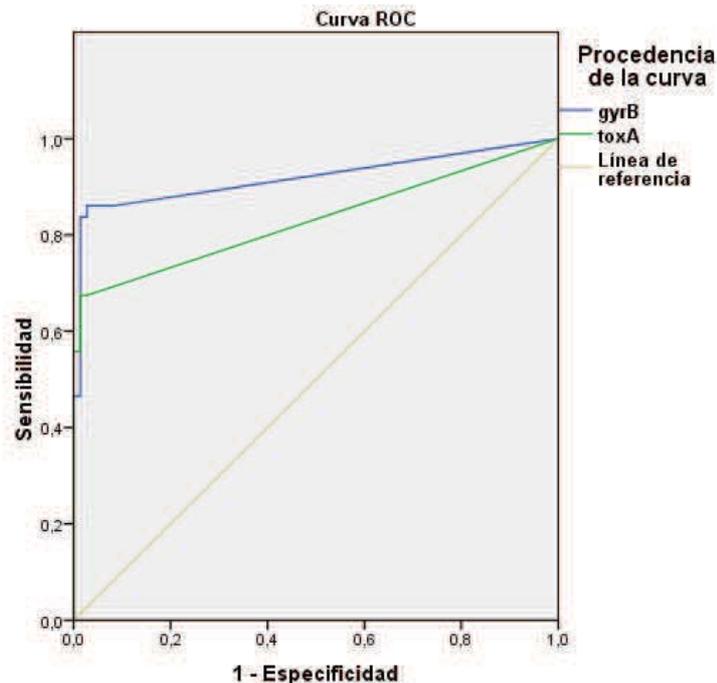


Figura 4.2.2.1.1. Curva ROC para diagnóstico de colonización actual para las dos técnicas de PCR *gyrB* y *toxA*

Los mejores puntos de corte obtenidos mediante curvas ROC se muestran en la Tabla-4.2.2.1.1. El área bajo la curva (AUC) es mejor para la PCR *gyrB* que con valores de 0,919 (IC95% 0,854-0,984) obtiene una clasificación de técnica muy buena. La clasificación de la PCR *toxA* es de técnica buena con un valor del área bajo la curva de 0,831 (0,742-0,921).

Para la PCR *toxA* el punto de corte de 20 UFC/muestra es el que tiene mejor exactitud, sensibilidad y especificidad. Para la PCR de la secuencia *gyrB* la mejor exactitud para detectar colonización se alcanza utilizando puntos de corte entre 30 y 40 UFC/muestra con mejor sensibilidad para el primero y mejor especificidad para el segundo. Se ha seleccionado el punto de corte intermedio de 35 UFC/muestra.

Tabla-4.2.2.1.1. Sensibilidad, especificidad y eficacia para identificar pacientes colonizados por *P.aeruginosa* para cada una de las técnicas de PCR

<i>Técnica</i>	<i>Punto de corte</i> ¹	<i>S</i> ² (%)	<i>E</i> ² (%)	<i>Ex</i> ² (%)	<i>AUC</i> ²
<i>PCR gyrB</i>	30	86,0	97,3	93,1	0,919
	40	83,7	98,6	93,1	0,919
<i>PCR toxA</i>	20	66,7	97,1	85,8	0,831

¹ Expresado como el n° de UFC/ml a partir del cual se puede diagnosticar colonización por *P.aeruginosa*

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, Ex=exactitud. AUC= área bajo la curva.

Utilizando estos puntos de corte calculados mediante curvas ROC, se ha valorado la capacidad de cada técnica para identificar la colonización por *P.aeruginosa* con los resultados obtenidos con una sola muestra. Se han agrupado las muestras en dos categorías, muestras de pacientes no colonizados, grupos 1, 2 y 3, y colonizados por *P.aeruginosa*, grupos 4 y 5. Se han valorado los resultados del cultivo y de cada una de las técnicas de PCR por separado y combinadas con el cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla-4.2.2.1.2.

Tabla-4.2.2.1.2. Resultado de las distintas técnicas según colonización por *P.aeruginosa*

<i>Colonización P.aeruginosa</i> ^{1, 2}	<i>Cultivo Positivo</i>	<i>PCRgyrB ≥35UFC</i>	<i>PCRgyrB ≥35 y/o Cultivo+</i>	<i>PCRtoxA ≥20UFC</i>	<i>PCR toxA ≥20 y/o cultivo+</i>
No (n=73)	0(0,0)	2(2,7)	2(2,7)	1(1,4)	1(1,4)
Sí (n=43)	19(44,2)	37(86,0)	37(86,0)	29(67,4)	31(72,1)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	39(33,6)	39(33,6)	30(25,9)	32(27,6)
S	44,2 (30,4-58,9)	86,0 (72,7-86,2)	86,0 (72,7-86,2)	67,4 (52,5-79,5)	72,1 (57,3-83,3)
E	100 (95,0-100)	97,3 (90,5-99,2)	97,3 (90,5-99,2)	98,6 (92,6-99,8)	98,6 (92,6-99,8)
VPP	100 (83,2-100)	94,9 (83,1-98,6)	94,9 (83,1-98,6)	96,7 (83,3-99,4)	96,9 (84,3-99,4)
VPN	75,3 (65,8-82,8)	92,2 (84,0-96,4)	92,2 (84,0-96,4)	83,7 (74,5-90,0)	85,7 (76,7-91,6)
Ex	79,3 (71,1-85,7)	93,1 (87,0-96,5)	93,1 (87,0-96,5)	87,1 (79,8-92,0)	88,8 (81,8-93,3)
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹ Sin colonización = grupo 1+2+3; Con colonización = grupo 4+5. Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP=Valor predictivo positivo, VPN=Valor predictivo negativo, Ex=exactitud, p= nivel de la significación estadística de la diferencia entre grupos. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

Utilizando el punto de corte ≥ 35 UFC para la PCR *gyrB*, la exactitud (93,1%) de esta técnica mejora y es superior a la obtenida únicamente mediante el cultivo (79,3%). La combinación con el cultivo no varía los resultados en el caso de la PCR *gyrB* ya que todas las muestras positivas por cultivo lo fueron también para la PCR *gyrB*. En ambos casos se supera ampliamente la sensibilidad (86,0%) frente a la obtenida con el resultado aislado del cultivo (44,2%).

En el caso de la PCR *toxA* ≥ 20 UFC tanto la exactitud (87,1%) como la sensibilidad (67,4%) son peores a las obtenidas con la PCR *gyrB* ≥ 35 UFC pero mejores que con el cultivo. Combinando el cultivo con el resultado de la PCR *toxA* ≥ 20 UFC mejora ligeramente los resultados pero quedan por debajo de los obtenidos con la técnica de PCR *gyrB* ≥ 35 UFC sola o combinada con el cultivo.

En la Tabla-4.2.2.1.3.se resumen algunas características de las dos muestras de pacientes sin colonización actual con resultados positivos por encima de los puntos de corte seleccionados para cada una de las técnicas de PCR. En una de las muestras ambas técnicas de PCR eran positivas.

Tabla-4.2.2.1.3. Características de las 2 muestras de pacientes no colonizados con resultados de PCR *gyrB* positivas

<i>Grupo¹</i>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 3</i>
<i>Antecedentes de Colonización</i>	<i>Nunca</i>	<i>Intermitente</i>
<i>Tipo muestra utilizada principalmente en el seguimiento microbiológico habitual</i>	<i>Ex faríngeo</i>	<i>Ex faríngeo</i>
<i>Nº total muestras cultivadas²</i>	8	17
<i>Tiempo desde último cultivo positivo a P.aeruginosa (meses)</i>	<i>Nunca</i>	19
<i>Tiempo hasta siguiente cultivo positivo a P.aeruginosa (meses)</i>	25	23
<i>Otros gérmenes aislados en el cultivo</i>	<i>No</i>	<i>S.aureus / hongos</i>
<i>PCRgyrB / PCRtoxA (nº UFC/ml)</i>	40 / Neg	735 / 155

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*, Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica.

²En los 12 meses previos y posteriores a la toma de la muestra, utilizados para la clasificación del estatus de colonización.

4.2.2.2. Cuantificación del DNA y diagnóstico de colonización crónica.

También se ha valorado la utilidad de la cuantificación para identificar la colonización crónica. Mediante curvas ROC se han calculado los mejores puntos de corte, utilizando el resultado cuantitativo de cada una de las técnicas de PCR. La representación gráfica de las curvas ROC para las dos pruebas de PCR se muestran en la Figura-4.2.2.2.1.

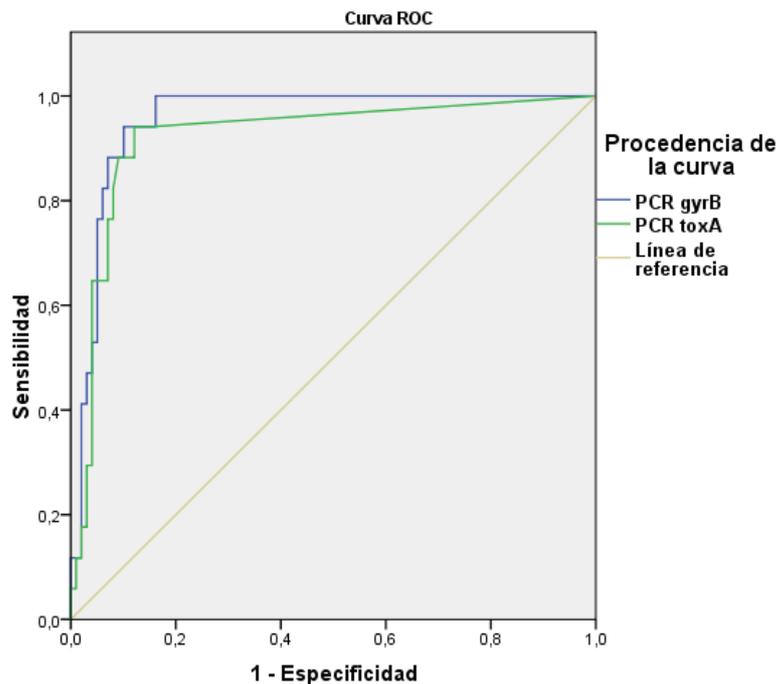


Figura-4.2.2.2.1. Curva ROC para diagnóstico de colonización crónica para las dos técnicas de PCR*gyrB* y *ToxA*

El área bajo la curva (AUC) es más elevada para la PCR *gyrB* (0,955, IC95% 0,919-0,991) que para la PCR *toxA* (0,921, 0,846-0,996) con una valoración de ambas pruebas de test muy bueno. Los resultados se muestran en el Tabla-4.2.2.2.1. Para la PCR*gyrB* el punto de corte con mayor eficacia y especificidad para identificar pacientes con colonización crónica es 5000 UFC/ml, mientras que el mejor resultado para la PCR*toxA* sería el de 1500 UFC/ml.

Tabla-4.2.2.2.1. Sensibilidad, especificidad y eficacia para identificar pacientes con colonización crónica por *P.aeruginosa* para cada una de las técnicas de PCR

<i>Técnica</i>	<i>Punto de corte</i> ¹	<i>S</i> ² (%)	<i>E</i> ² (%)	<i>Ex</i> ² (%)	<i>AUC</i> ²
PCR <i>gyrB</i>	5000	76,5	94,9	92,2	0,955
PCR <i>ToxA</i>	1500	64,7	96,0	91,4	0,921

¹ Expresado como el n° de UFC/muestra a partir del cual se puede diagnosticar colonización por *P.aeruginosa*

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, Ex=exactitud. AUC= área bajo la curva.

Utilizando estos puntos de corte calculados mediante curvas ROC, se ha valorado la capacidad de cada técnica para identificar la colonización crónica con los resultados obtenidos con una sola muestra. Se han agrupado las muestras en dos categorías, muestras de pacientes no colonizados crónicamente, grupos 1, 2, 3 y 4, y colonizados crónicamente por *P.aeruginosa*, grupos 5. Se han valorado los resultados del cultivo y de cada una de las técnicas de PCR por separado y combinadas. Los resultados se muestran en la Tabla-4.2.2.2.2.

Tabla-4.2.2.2.2. Resultado de las distintas técnicas en el diagnóstico de colonización crónica por *P.aeruginosa*

<i>Colonización crónica <i>P.aeruginosa</i></i> ^{1,2}	<i>Cultivo Positivo</i>	<i>PCRgyrB ≥5000 UFC</i>	<i>PCRtoxA ≥1500 UFC</i>	<i>PCRgyrB ≥5000 + PCRtoxA ≥1500</i>
No (n=99)	8(8,1)	5(5,1)	4(4,0)	3(3,0)
Sí (n=17)	11(64,7)	13(76,5)	11(64,7)	11(64,7)
TOTAL(n= 116)	19(16,4)	18(15,5)	15(12,9)	13(12,1)
S	64,7 (41,3-82,7)	76,5 (52,7-90,4)	64,7 (41,3-82,7)	64,7 (41,3-82,7)
E	91,9 (84,9-95,8)	94,9 (88,7-97,8)	96,0 (90,1-98,4)	97,0 (91,5-99,0)
VPP	57,9 (36,3-76,9)	72,2 (49,1-87,1)	73,3 (48,0-89,1)	78,6 (52,4-92,4)
VPN	93,8 (87,2-97,1)	95,9 (90,0-98,4)	94,1 (87,6-97,2)	94,1 (87,8-97,3)
Ex	87,9 (80,8-92,7)	92,2 (85,9-95,9)	91,4 (84,9-95,3)	92,2 (85,9-95,9)
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹ Sin colonización crónica = grupo 1+2+3+4; Colonizados crónicamente =grupo 5. Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP=Valor predictivo positivo, VPN=Valor predictivo negativo, Ex=exactitud, p= nivel de la significación estadística de la diferencia entre grupos.

En porcentaje (Intervalo de confianza 95%)

Un resultado de cultivo positivo aislado tiene un VPP bajo (57,9%) para clasificar a un paciente de colonización crónica, mientras que los resultados que se obtienen con la PCR $gyrB$ y PCR $toxA$ de forma individual o utilizando los resultados combinados de ambas tienen un VPP mayor (72,2%, 73,7% y 78,6% respectivamente), conservando un VPN bueno (95,9 y 94,1% respectivamente). Tanto con la PCR $gyrB$ sola como con los resultados combinados de ambas PCR se obtienen los mejores valores de exactitud (92,2%), aunque con la PCR $gyrB$ sola tiene mejor sensibilidad y VPN.

En las muestras con un resultado de cultivo negativo, los resultados de las dos técnicas de PCR tanto individualmente como combinadas se correlacionan estadísticamente con el diagnóstico de colonización crónica ($p < 0,001$). Por el contrario, en muestras con un resultado positivo de cultivo los resultados son peores y para las dos PCR, solas o en combinación, la relación con el diagnóstico de colonización crónica por *P.aeruginosa* no alcanza significación estadística (Tabla-4.2.2.2.3).

Tabla-4.2.2.2.3. Relación entre colonización crónica por *P.aeruginosa* y el resultado de las distintas variables según resultado del cultivo

<i>Cultivo</i>	<i>PCRgyrB</i> ≥ 5000 ¹	<i>PCRtoxA</i> ≥ 1500 ¹	<i>PCRgyrB</i> ≥ 5000 + <i>PCRtoxA</i> ≥ 1500 ¹
<i>NEGATIVO</i>	<i>Sí</i> ($p < 0,001$)	<i>Sí</i> ($p < 0,001$)	<i>Sí</i> ($p < 0,001$)
<i>POSITIVO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>

¹ Unidades formadoras de colonias/ ml

4.2.3. Detección de anticuerpos anti-*P.aeruginosa*. Comparación con el cultivo.

En las muestras de suero se había analizado la presencia de anticuerpos frente a 3 antígenos de *P.aeruginosa*, Proteasa alcalina (PA), Elastasa (ELA), y Exotoxina A (ETA) según se describe en material y métodos. Para el cálculo del título de anticuerpos se había construido una recta de calibración (recta de regresión lineal) con los tres controles de título conocido utilizando el programa Excel cada vez que se había realizado el ensayo. La media de los valores del coeficiente de determinación (R^2) de las rectas de regresión lineal obtenidas fue de 0,99 (rango 0,92-1) para el antígeno PA, 0,98(0,91-1) para ELA y 0,99 (0,96-1) para ETA.

El valor de la mediana del título de anticuerpos para cada grupo y frente a cada uno de los antígenos aparece en la Tabla-4.2.3.1.

Tabla-4.2.3.1 Distribución por grupos de la mediana del título de anticuerpos para cada uno de los antígenos utilizados

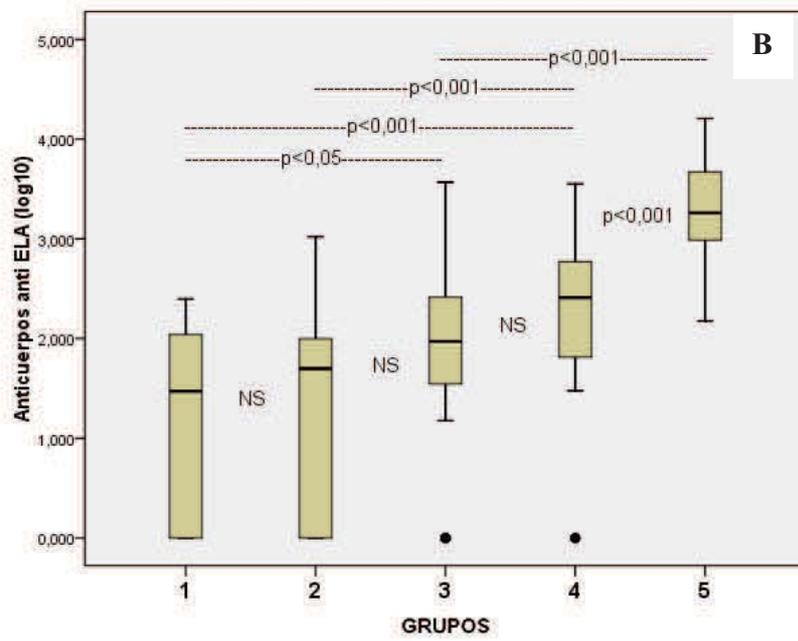
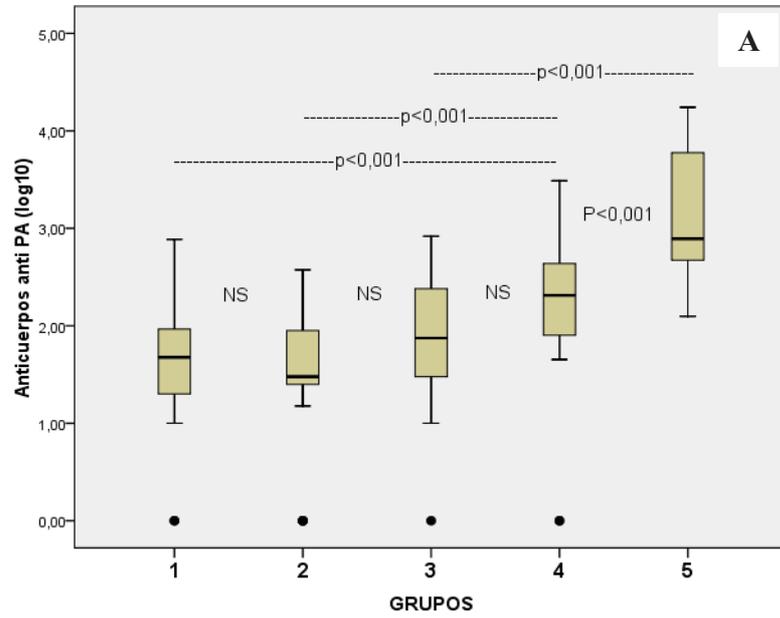
<i>Pacientes</i> ¹	<i>Título anticuerpos</i> ^{2,3}		
	<i>PA</i>	<i>ELA</i>	<i>ETA</i>
Grupo 1 (n = 24)	47,5 (20 / 93,75)	30 (0 / 115)	45 (20 / 123,75)
Grupo 2 (n = 27)	30 (25 / 100)	50 (0 / 110)	90 (10 / 275)
Grupo 3 (n = 22)	75 (26,5 / 285)	95 (32,5 / 281,25)	187 (65 / 552,5)
Grupo 4 (n = 26)	205 (75 / 438,75)	257,5 (63,75 / 640)	480 (97,5 / 1073,75)
Grupo 5 (n = 17)	780 (430 / 6855)	1825 (705 / 6185)	2700 (1165 / 11052,5)
TOTAL (n= 116)	97,5 (30 / 375)	105 (25 / 373,75)	165 (46,25 / 802,5)

¹Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica.

²Valor inverso del título. Mediana (cuartil 1/ cuartil 3)

³ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A.

Todos estos resultados se representan gráficamente en las Figuras 4.2.3.1-A, B y C junto con la significación estadística de la diferencia en el título de anticuerpos entre los diferentes grupos analizados. Existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 5 y todos los demás grupos ($P < 0,001$). También entre el grupo 4 y los grupos 1 ($p < 0,001$) y 2 ($p < 0,01$) pero no con el grupo 3. Las diferencias no eran estadísticamente significativas entre el grupo 3 y los grupos 2 y 4. Entre el grupo 3 y el grupo 1 solo lo eran para los antígenos ELA ($< 0,05$) y ETA ($p < 0,01$).



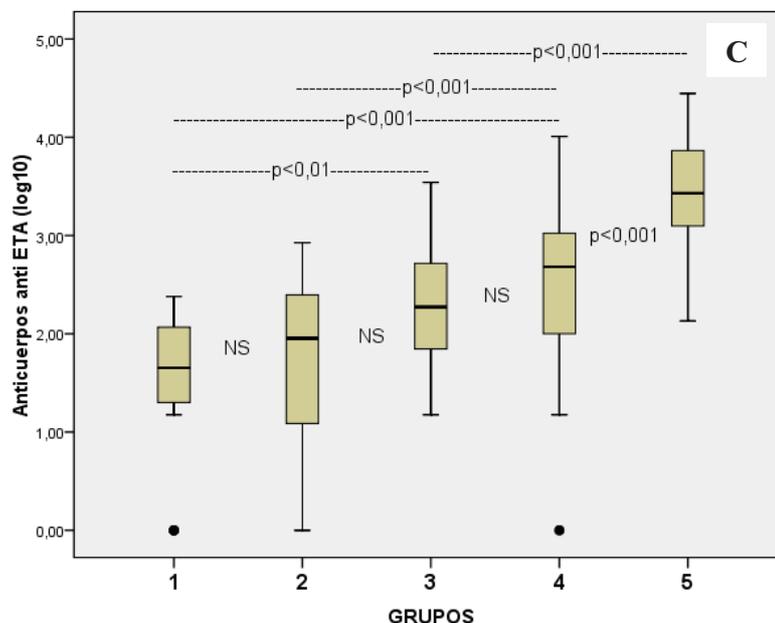


Figura 4.2.3.1. Representación gráfica de la mediana del título de anticuerpos frente al antígeno PA (A), ELA (B) y ETA para cada uno de los grupos estudiados. En los gráficos la línea representa el valor de la mediana, el límite superior de la caja corresponde al valor del tercer cuartil (75% de los datos) y el límite inferior al primer cuartil (25%); las dos barras verticales determinan el rango del 95% de los casos. Los valores atípicos están señalados con un punto. Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica.

En el caso de la detección de anticuerpos, el objetivo del trabajo ha sido reevaluar los títulos de anticuerpos ya obtenidos por técnica de enzaimmunoensayo (EIA) frente a los tres antígenos (Exoproteína A, Proteasa alcalina y Elastasa) de *P. aeruginosa* y utilizados para el diagnóstico de la colonización crónica por este microorganismo.

Aunque la finalidad inicial de las pruebas serológicas en el contexto de la fibrosis quística es identificar a los pacientes con colonización crónica, se ha valorado su utilidad para el diagnóstico de la colonización tanto actual como crónica por *P.aeruginosa*. En primer lugar se ha evaluado su valor adicional para detectar la colonización por *P.aeruginosa* y por tanto valorar si podría usarse la serología también en el seguimiento de los pacientes con FQ con esta finalidad. En segundo lugar se ha reevaluado su capacidad para el diagnóstico de la colonización crónica.

4.2.3.1. Título de anticuerpos y diagnóstico de colonización.

Para buscar los puntos de corte idóneos para identificar la colonización actual por *P.aeruginosa* se han reanalizado los resultados del EIA mediante curvas ROC. Los resultados de las tres pruebas serológicas valoradas individualmente para diferenciar entre muestras de pacientes con colonización (grupos 4 y 5; 43 pacientes) y pacientes no colonizados por *P.aeruginosa* (grupo 1, 2 y 3; 73 pacientes) se muestran en la Figura 4.2.3.1.1.

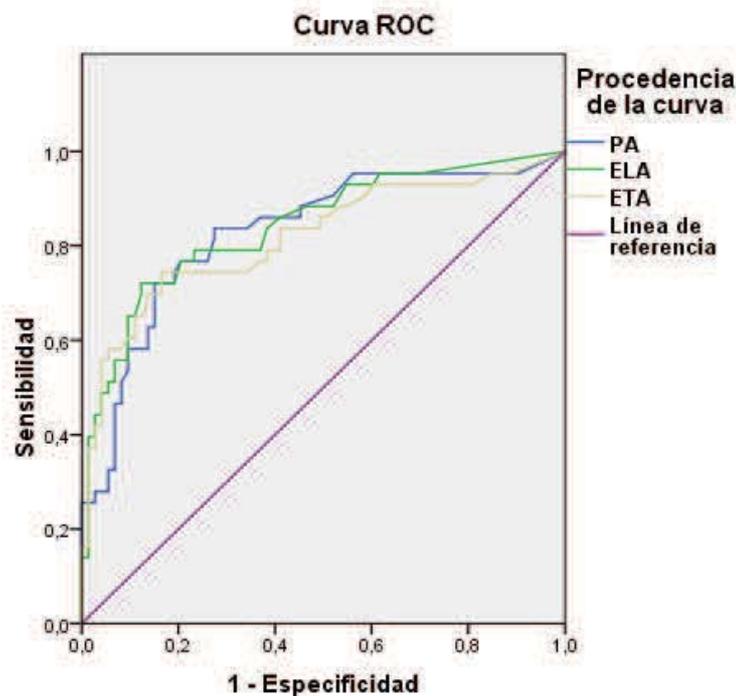


Figura 4.2.3.1.1. Curva ROC para diagnóstico de colonización actual para los tres antígenos, Proteasa alcalina (PA), Elastasa (ELA) y Exotoxina A (ETA) valorados individualmente

Los mejores puntos de corte para diferenciar entre colonización por *P.aeruginosa* de ausencia de colonización para cada uno de los antígenos utilizados aparecen en la Tabla 4.2.3.1.1. Estos puntos de corte discriminan entre colonización y ausencia de colonización, con una área bajo la curva (AUC) más elevada para la determinación de anticuerpos anti-ELA (0,842, IC 95% 0,764-0,919) y una valoración como test bueno. Las AUC para las determinaciones de anticuerpos anti-PA (0,829, 0,748-0,910) y anti-ETA (0,818, 0,731-0,904) son menores pero alcanzan también una valoración de test bueno para ambas pruebas.

Tabla 4.2.3.1.1. Puntos de corte para colonización por *P.aeruginosa* para cada antígeno.

<i>Antígeno</i> ¹	<i>Punto corte</i> ²	<i>S (%)</i> ³	<i>E (%)</i> ³	<i>Ex (%)</i> ³	<i>AUC</i> ³
<i>PA</i>	180	72,1	84,9	80,2	0,829
<i>ELA</i>	240	72,1	87,7	81,9	0,842
<i>ETA</i>	800	58,1	94,5	81,0	0,818

¹ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A.

² Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual la colonización actual por *P. aeruginosa* puede considerarse crónica

³ S=Sensibilidad, E=Especificidad, Ex=exactitud. En porcentaje. AUC= área bajo la curva.

El punto de corte con mayor exactitud lo presenta la determinación de anticuerpos anti ELA (81,9%) para el título 1/240 con especificidad del 87,7% y sensibilidad del 72,1%. Para PA se ha seleccionado el punto de corte 1/180 con especificidad del 84,9%, sensibilidad del 72,1% y exactitud del 80,2%. Puesto que para ETA había dos puntos de corte con igual exactitud (81%), se ha escogido el que tenía mejor sensibilidad, 1/800. Con este punto de corte la especificidad para ETA es la mayor (94,5%) pero con sensibilidad menor (58,1%). Los resultados para cada grupo con estos puntos de corte y para cada antígeno se muestran en la tabla 4.2.3.1.2.

Tabla 4.2.3.1.2. Muestras positivas utilizando los puntos de corte óptimos obtenidos por curvas ROC para cada uno de los antígenos valorados individualmente

<i>GRUPO</i> ¹	<i>Antígeno y punto corte</i> ²		
	<i>PA</i> ≥ 180	<i>ELA</i> ≥ 240	<i>ETA</i> ≥ 800
<i>Grupo 1 (n = 24)</i>	2(8,3)	1(4,2)	0
<i>Grupo 2 (n = 27)</i>	3(11,1)	2(7,4)	1(3,7)
<i>Grupo 3 (n = 22)</i>	6(27,3)	6(27,3)	3(13,6)
<i>Grupo 4 (n = 26)</i>	15(57,7)	15(57,7)	10(38,5)
<i>Grupo 5 (n = 17)</i>	16(94,1)	16(94,1)	15(88,2)
<i>TOTAL (n= 116)</i>	<i>42(36,2)</i>	<i>40(34,5)</i>	<i>29(25,0)</i>

¹ Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica.

² PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo. Número (% respecto al total de cada grupo)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para cada uno de los tres antígenos entre los grupos 1, 2 o 3 con el grupo 4 ($p < 0,01$, $p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) y con el grupo 5 ($p < 0,001$ para todos ellos). La única excepción fue el antígeno ETA para el cual las diferencias no fueron significativas entre el grupo 3 y 4.

También fueron significativas las diferencias entre los grupos 4 y 5 entre sí ($p < 0,05$). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos 1, 2 y 3 de pacientes no colonizados entre sí con la excepción del antígeno ELA entre los grupos 1 y 3, que sí fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

También se han valorado los resultados combinados de los tres antígenos, utilizando para cada uno el punto de corte seleccionado mediante curvas ROC. A este punto de corte combinado se le ha denominado punto de corte COLONIZADO. Se ha tenido en cuenta la positividad acumulada frente a uno, dos o los tres antígenos. Los resultados para cada uno de los grupos se exponen en la Tabla-4.2.3.1.3.

Tabla 4.2.3.1.3. Muestras positivas utilizando los puntos de corte óptimos obtenidos mediante curvas ROC para uno o más de los antígenos valorados globalmente

<i>GRUPO¹</i>	<i>Punto corte COLONIZADO</i>		
	<i>PA\geq180 y/o ELA\geq 240 y/o ETA\geq800²</i>		
	<i>≥ 1</i>	<i>≥ 2</i>	<i>3</i>
<i>Grupo 1 (n = 24)</i>	<i>2(8,3)</i>	<i>1(4,2)</i>	<i>0</i>
<i>Grupo 2 (n = 27)</i>	<i>5(18,5)</i>	<i>1(3,7)</i>	<i>0</i>
<i>Grupo 3 (n = 22)</i>	<i>7(31,8)</i>	<i>5(22,7)</i>	<i>3(13,6)</i>
<i>Grupo 4 (n = 26)</i>	<i>20(76,9)</i>	<i>15(57,7)</i>	<i>6(23,1)</i>
<i>Grupo 5 (n = 17)</i>	<i>17(100)</i>	<i>17(100)</i>	<i>13(76,5)</i>
<i>TOTAL (n= 116)</i>	<i>51(44,0)</i>	<i>39(33,6)</i>	<i>22(19,0)</i>

¹ Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por P.aeruginosa; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica.

² PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo. Número de pacientes (porcentaje respecto al total de cada grupo) con resultados positivos a 1 o más antígenos (≥ 1) y a 2 o más antígenos (≥ 2).

Al valorar la presencia de anticuerpos frente al menos un antígeno, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1, 2 o 3 con respecto al grupo 4 ($p < 0,001$, $p > 0,001$ o $p < 0,05$, respectivamente) y grupo 5 ($p < 0,001$) y entre los grupos 4 y 5 entre sí ($p < 0,05$), es decir entre pacientes colonizados y no colonizado. Cuando se utiliza como criterio de positividad la presencia de anticuerpos como mínimo frente a dos antígenos, las diferencias son significativas entre los grupos 4 y 5 entre sí ($p < 0,01$) y entre estos dos con los grupos 1 ($p < 0,001$), 2 ($p < 0,001$) o 3 ($p < 0,05$). Cuando se utiliza como criterio de

positividad la presencia de anticuerpos como mínimo frente a tres antígenos, las diferencias únicamente son significativas ($p < 0,01$) entre el grupo 5 y los demás grupos.

Para valorar la capacidad de la detección de anticuerpos para identificar colonización con los resultados de una sola muestra, se han comparado los resultados obtenidos con el cultivo con los de las técnicas de detección de anticuerpos, ya sea de forma individual como combinada. En este último caso, se ha valorado la positividad acumulada frente a uno, dos o los tres antígenos. Los resultados obtenidos con los puntos de corte calculados mediante curvas ROC para cada antígeno se exponen en la Tabla-4.2.3.1.4. Existe relación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre la colonización por *P.aeruginosa* y los resultados de todas las técnica.

Tabla 4.2.3.1.4. Resultados obtenidos para la colonización por *P.aeruginosa* tanto individual como globalmente para cada uno de los antígenos con los puntos de corte calculados mediante curvas ROC

Colonización por <i>P.aeruginosa</i> ^{1,2}	Cultivo positivo	PA ≥ 330	ELA ≥ 240	ETA ≥ 800	Pto. corte COLONIZADO ³		
					≥ 1	≥ 2	≥ 3
No (n=73)	0(0,0)	11(15,1)	9(12,3)	4(5,5)	14(19,2)	7(9,6)	3(4,1)
Sí (n=43)	19(44,2)	31(72,1)	31(72,1)	25(58,1)	37(86,0)	32(74,4)	19(44,2)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	42(36,2)	40(34,5)	29(25,0)	51(44,0)	39(33,6)	22(20,6)
S	44,2 (30,4-58,9)	72,1 (57,3-83,3)	72,1 (57,3-83,3)	58,1 (43,3-71,6)	86,0 (72,7-94,7)	74,4 (59,8-85,1)	46,3 (32,1-61,3)
E	100 (95,0-100)	84,9 (75,0-91,4)	87,7 (78,2-93,4)	94,5 (86,7-97,8)	80,8 (70,3-88,2)	90,4 (81,5-95,3)	95,5 (87,5-98,4)
VPP	100 (83,2-100)	73,8 (58,9-84,7)	77,5 (62,5-87,7)	86,2 (69,4-94,5)	72,5 (59,1-82,9)	82,1 (67,3-91,0)	86,4 (66,7-95,3)
VPN	75,3 (65,8-82,8)	83,8 (73,8-90,5)	84,2 (74,4-90,7)	79,3 (69,6-86,5)	90,8 (81,3-95,7)	85,7 (76,2-91,8)	74,1 (63,9-82,2)
Ex	79,3 (71,1-85,7)	80,2 (72,0-86,4)	81,9 (73,9-87,8)	81,0 (73,0-87,1)	82,8 (74,9-88,6)	84,5 (76,2-90,0)	76,6 (67,8-83,6)
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Sin colonización = grupo 1+2+3; Con colonización = grupo 4+5. Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³Pto. corte COLONIZADO: positividad acumulada frente a uno, dos o los tres antígenos con títulos PA ≥ 180 y/o ELA ≥ 240 y/o ETA ≥ 800

Se ha hecho lo mismo con el punto de corte 1/500 para valorar su posible utilidad para el diagnóstico de la colonización por *P.aeruginosa*. El manual de la técnica contempla este punto de corte como dudoso para el diagnóstico de la colonización crónica pero parece interesante comprobar su capacidad para diferenciar entre pacientes no colonizados y colonizados por la comodidad que supone la utilización de un punto de corte único para todos los antígenos y porque es cercano a los puntos de corte calculados mediante curvas ROC. Los resultados se muestran en la Tabla-4.2.3.1.5.

Tabla 4.2.3.1.5. Resultados obtenidos para la colonización por *P.aeruginosa* tanto individual como globalmente para cada uno de los antígenos utilizando el punto de corte 1/500

Colonización por <i>P.aeruginosa</i> ^{1,2}	Cultivo positivo	PA ≥500	ELA ≥500	ETA ≥500	PA y/o ELA y/o ETA ≥500 ³		
					≥1	≥2	≥3
No (n=73)	0(0,0)	5(6,8)	3(4,1)	10(13,7)	14(19,2)	3(4,1)	1(1,4)
Sí (n=43)	19(44,2)	15(34,9)	21(48,8)	29(67,4)	34(79,1)	22(51,2)	9(20,9)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	20(17,2)	24(20,7)	39(33,6)	48(41,4)	25(21,6)	10(8,6)
S	44,2 (30,4-58,9)	34,9 (22,4-49,8)	48,8 (34,6-63,2)	67,4 (52,5-79,5)	79,1 (64,8-88,6)	51,2 (36,8-65,4)	20,9 (11,4-35,2)
E	100 (95,0-100)	93,2 (84,9-97,0)	95,9 (88,6-98,6)	86,3 (76,6-92,4)	80,8 (70,3-88,2)	95,9 (88,6-98,6)	98,6 (92,6-99,8)
VPP	100 (83,2-100)	75,0 (53,1-88,8)	87,5 (69,0-95,7)	74,4 (58,9-85,4)	70,8 (56,8-81,8)	88,0 (70,0-95,8)	90,0 (59,6-98,2)
VPN	75,3 (65,8-82,8)	70,8 (61,1-79,0)	76,1 (66,4-83,6)	81,8 (71,8-88,8)	86,8 (76,7-92,9)	76,9 (67,3-84,4)	67,9 (58,5-76,0)
Ex	79,3 (71,1-85,7)	71,6 (62,8-79,0)	76,1 (66,4-83,6)	79,3 (71,1-85,7)	80,2 (72,0-86,4)	79,3 (71,1-85,7)	69,8 (60,9-77,4)
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Sin colonización = grupo 1+2+3; Con colonización = grupo 4+5. Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³ Positividad acumulada frente a uno, dos o los tres antígenos.

Individualmente los puntos de corte calculados mediante curvas ROC se comportan mejor que el punto de corte único de 1/500. El mejor resultado de exactitud se obtiene con la detección de anticuerpos anti ELA ≥1/240 (81,9%). La sensibilidad (72,1%) y el valor predictivo negativo (84,2%) son superiores al cultivo (44,2% y 75,3%, respectivamente) aunque la especificidad y el VPP son inferiores a los del cultivo (100%).

También son mejores los resultados combinados de los tres antígenos utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROC (punto de corte COLONIZADO) que utilizando el punto de corte 1/500. Cuando se utiliza como criterio de positividad la presencia de anticuerpos frente al menos uno de los antígenos, la sensibilidad del punto de corte COLONIZADO (86,0%) y el VPN (90,8%) son superiores al cultivo (44,2% y 75,3%, respectivamente) y mejores que los obtenidos con el antígeno ELA individualmente (72,1 y 87,7%). También la exactitud (82,8%) es mejor que la del cultivo (79,3%). Cuando se utiliza como criterio de positividad la presencia de anticuerpos frente al menos dos de los antígenos, la exactitud del punto de corte COLONIZADO (84,5%) mejora. Sin embargo, la sensibilidad (74,4%) y el VPN (85,7%) son menores aunque continúan siendo mejores que los del cultivo aislado (44,2% y 75,3%, respectivamente) y mejores que los obtenidos con el antígeno ELA individualmente (72,1 y 87,7%). En ambos casos, la especificidad y el VPP son inferiores al cultivo (100%), como también ocurre con el antígeno ELA individualmente.

4.2.3.2 Título de anticuerpos y diagnóstico de colonización crónica.

En segundo lugar, se han calculado los puntos de corte óptimos para el diagnóstico de la colonización crónica mediante curvas ROC. En la Figura 4.2.3.2.1 se muestran las curvas ROC para las tres pruebas serológicas valoradas individualmente.

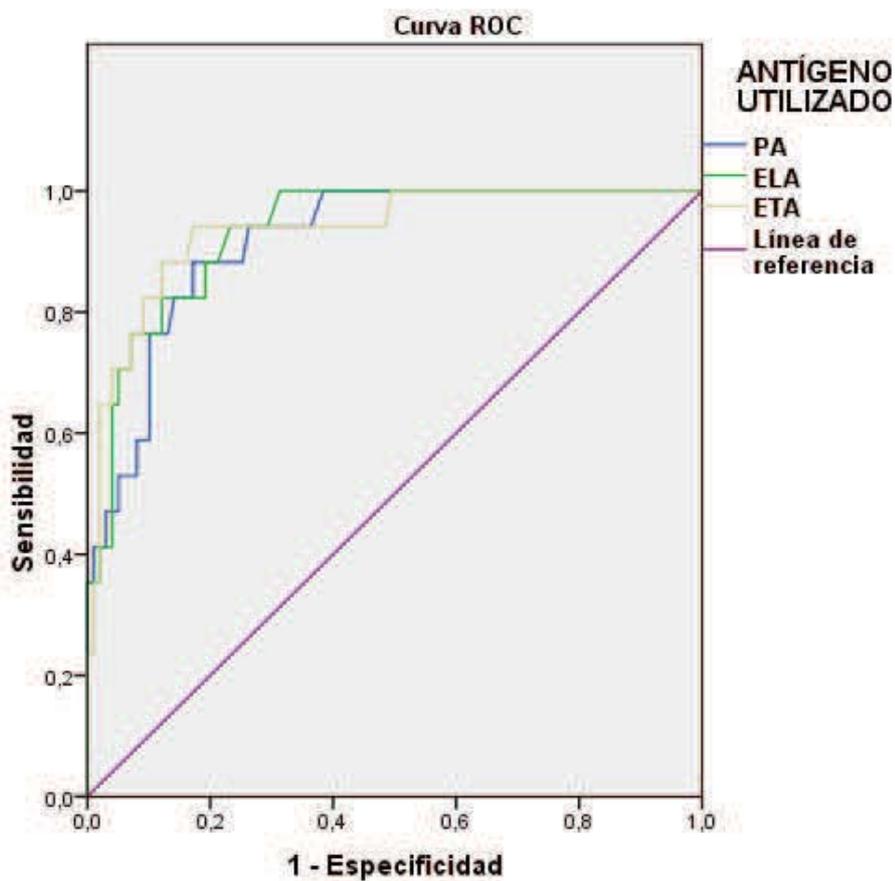


Figura 4.2.3.2.1. Curva ROC para diagnóstico de colonización crónica para los tres antígenos, Proteasa alcalina (PA), Elastasa (ELA) y Exotoxina A (ETA), valorados individualmente

Discriminan bien entre presencia y ausencia de colonización crónica, con áreas bajo la curva (AUC) más elevadas para la determinación de anticuerpos anti-ETA (0,935, IC95% 0,875-0,996) y anti-ELA (0,933, 0,882-0,984) y una valoración de ambas pruebas como test

muy bueno. El AUC para la determinación de anticuerpos anti-PA es menor (0,917, 0,858-0,975), pero también alcanza la valoración de test muy bueno.

Los mejores puntos de corte individuales para diferenciar entre el grupo 5, con colonización crónica, y los grupos sin aislamiento crónico de *P.aeruginosa* (grupos 1, 2, 3 y 4) para cada uno de los antígenos utilizados aparecen en la Tabla-4.2.3.2.1.

Tabla-4.2.3.2.1. Puntos de corte para colonización crónica por *P.aeruginosa* calculados mediante curvas ROC para cada antígeno

<i>Antígeno</i> ¹	<i>Punto corte</i> ²	<i>S</i> ³ (%)	<i>E</i> ³ (%)	<i>Ex</i> ³ (%)	<i>AUC</i> ⁴
<i>PA</i>	1900	41,2	99,0	90,5	0,917
<i>ELA</i>	1500	64,7	96,0	91,4	0,933
<i>ETA</i>	1900	64,7	97,0	92,2	0,935

¹ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A.

² Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual la colonización actual por *P. aeruginosa* se puede considerarse crónica

³ S=Sensibilidad, E=Especificidad, Ex=exactitud. En porcentaje.

⁴AUC= área bajo la curva.

El mejor valor de exactitud (92,2%) lo presenta la determinación de anticuerpos anti ETA para el título 1/1900 con una sensibilidad del 64,7% y especificidad del 97,0%. Para ELA, el punto de corte con las mejores características es el título 1/1500 con eficacia del 91,4% y especificidad del 96,0%. El punto de corte seleccionado para PA fue el título 1/1900 que tiene una eficacia (90,5%) menor que las de ETA y ELA y una especificidad del 99%. Las sensibilidades que se obtienen con los puntos de corte seleccionados mediante curvas ROC para ELA y PA fueron del 41,2% y 64,7%, respectivamente.

En la Tabla 4.2.3.2.2 se muestran los resultados individuales con cada antígeno y para cada uno de los grupos utilizando estos puntos de corte, 1/1900 para PA, 1/1500 para ELA y 1/1900 para ETA. Estos resultados se han comparado con los obtenidos utilizando los criterios del manual de la técnica que considera el punto de corte 1/1250 como positivo para la colonización crónica. Además se muestran los resultados obtenidos con el punto de corte 1/500 considerado como dudoso por el manual de la técnica pero con mejores resultados según algunos autores para el diagnóstico de la colonización crónica.

Tabla 4.2.3.2.2. Muestras positivas utilizando los puntos de corte obtenidos mediante curvas ROC y los recomendados en el manual de la técnica. Se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los antígenos individualmente.

GRUPO¹	PA²			ELA²			ETA²		
	Titulo anticuerpos³			Titulo anticuerpos³			Titulo anticuerpos³		
	≥500	≥1250	≥1900	≥500	≥1250	≥1500	≥500	≥1250	≥1900
Grupo 1 (n = 24)	1 (4,2)	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo 2 (n = 27)	0	0	0	2 (7,4)	0	0	3 (11,1)	0	0
Grupo 3 (n = 22)	4 (18,2)	0	0	1 (4,5)	1 (4,5)	1 (4,5)	7 (31,8)	2 (9,1%)	1 (4,5)
Grupo 4 (n = 26)	5 (19,2)	2 (7,7)	1 (3,8)	8 (30,8)	4 (15,4)	3 (11,5)	13 (50,0)	5 (19,2)	2 (7,7)
Grupo 5 (n = 17)	10 (58,8)	7 (41,2)	7 (41,2)	13 (76,5%)	12 (70,6)	11 (64,7)	16 (94,1)	13 (76,5)	11 (64,7)
TOTAL (n= 116)	20 (17,2)	9 (7,8)	8 (6,9)	24 (20,7)	17 (14,7)	15 (12,9)	39 (33,6)	20 (17,2)	14 (12,1)

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica. Nº muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

² PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A.

³ Valor inverso del título.

Al comparar el grupo 5 con colonización crónica con los demás grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ELA y ETA con los puntos de corte 1/500 ($p<0,01$), 1/1250 y 1/1500 ($p<0,001$). Las diferencias también fueron significativas para el antígeno PA cuando se utilizaron los tres puntos de corte 1/500 y 1/1250 ($p<0,05$) y 1/1900 ($p<0,01$).

Puesto que el manual de la técnica considera como colonización crónica las muestras con un título de anticuerpos igual o superior a 1/1250 frente al menos uno de los antígenos, se han valorado los resultados de los tres antígenos combinados utilizando los puntos de corte seleccionados mediante curvas ROC ($PA\geq 1900$ y/o $ELA\geq 1500$ y/o $ETA\geq 1900$). A este punto de corte combinado se le ha denominado punto de corte CRÓNICO y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.2.3.2.3.

Tabla 4.2.3.2.3. Muestras positivas utilizando los puntos de corte óptimos obtenidos mediante curvas ROC para uno o más de los antígenos valorados globalmente

GRUPO ¹	Punto corte CRONICO ² PA≥1900 y/o ELA≥ 1500 y/o ETA≥1900		
	≥1	≥2	=3
Grupo 1 (n = 24)	0	0	0
Grupo 2 (n = 27)	0	0	0
Grupo 3 (n = 22)	2(9,1)	0	0
Grupo 4 (n = 26)	6(23,1)	0	0
Grupo 5 (n = 17)	15(88,2)	10(58,8)	4(23,5)
TOTAL (n= 116)	23(19,8)	10(8,6)	4(3,4)

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

²PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo. N° de pacientes (% respecto al total de cada grupo) con resultados positivos a 1 o más antígenos (≥1), 2 o más antígenos (≥2) o a los tres antígenos (=3)

Se ha hecho lo mismo para los puntos de corte 1/500 y 1/1250 y los resultados combinados de los tres antígenos se muestran en la Tabla-4.2.3.2.4.

Tabla-4.2.3.2.4. Pacientes con muestras positivas utilizando los puntos de corte recomendados en el manual de la técnica para uno o más de los antígenos combinados

GRUPO ¹	PA y/o ELA y/o ETA ²					
	≥500			≥1250		
	≥1	≥2	=3	≥1	≥2	=3
Grupo 1 (n = 24)	1(4,2)	0	0	0	0	0
Grupo 2 (n = 27)	5(18,5)	0	0	0	0	0
Grupo 3 (n = 22)	8(36,4)	3(13,6)	1(4,5)	3(13,6)	0	0
Grupo 4 (n = 26)	17(65,4)	7(26,9)	2(7,7)	10(38,4)	1(3,8)	0
Grupo 5 (n = 17)	17(100)	15(88,2)	7(41,2)	15(88,2)	12(70,6)	5(29,4)
TOTAL (n= 116)	48(41,4)	25(21,6)	10(8,6)	28(24,1)	13(11,2)	5(4,3)

¹Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

²PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo. N° de pacientes (% respecto al total de cada grupo) con resultados positivos a 1 o más antígenos (≥1), 2 o más antígenos (≥2) o a los tres antígenos (=3)

Cuando se combinan los resultados de los tres antígenos utilizando el punto de corte crónico ($PA \geq 1/1900$ y/o $ELA \geq 1/1500$ y/o $ETA \geq 1/1900$) o el punto de corte 1/1250 no se encuentra reactividad en las muestras del grupo 1 y 2 y el mismo porcentaje de muestras del grupo 5 son positivas (88,2%).

Con el punto de corte 1/500 todos las muestras de pacientes con colonización crónica son positivas pero un elevado porcentaje (65,4%) de las muestras de pacientes con colonización intermitente también lo son. Al comparar los resultados combinados de los tres antígenos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre el grupo 5 y los demás grupos para los tres puntos de corte crónico, 1/500 y 1/1250.

Se ha comparado la capacidad para diagnosticar la colonización crónica combinando los resultados de los tres antígenos individuales utilizando el punto de corte crónico ($PA \geq 1/1900$ y/o $ELA \geq 1/1500$ y/o $ETA \geq 1/1900$). Estos resultados se han comparado con los resultados del cultivo y los resultados obtenidos utilizando los dos puntos de corte recomendados por el manual de la técnica, 1/1250 y 1/500. En los tres casos, se ha valorado la positividad acumulada frente uno o más de los antígenos siguiendo los criterios del manual de la técnica. Para intentar mejorar la especificidad de los resultados obtenidos con los antígenos combinados se ha valorado también la positividad acumulada frente a un mínimo de dos o tres antígenos.

En la Tabla-4.2.3.2.5 se muestran los resultados obtenidos considerando positivas las muestras con presencia de anticuerpos frente a un mínimo de un antígeno o a un mínimo de dos antígenos. No se muestran los resultados para tres antígenos por la pobre sensibilidad de este criterio. Se exponen los resultados de sensibilidad, especificidad y efectividad para diferenciar entre colonización crónica (grupo 5) y ausencia de colonización crónica (grupos 4, 3, 2 y 1). Se encontró relación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre los resultados de todas las técnicas y la situación o no de colonización crónica.

Si se valoran como positivas las muestras con anticuerpos frente a uno o más antígenos utilizando el punto de corte crónico ($PA \geq 1/1900$ y/o $ELA \geq 1/1500$

y/oETA \geq 1/1900), la sensibilidad aumenta hasta el 88,2% con respecto a los antígenos individuales aunque la especificidad desciende hasta el 91,9%.

Tabla 4.2.3.2.5. Resultados obtenidos para el diagnóstico de colonización crónica por *P.aeruginosa* combinando los resultados de los tres antígenos

Colonización crónica <i>P.aeruginosa</i> ^{1, 2}	Cultivo positivo	PA y/o ELA y/o ETA \geq 500		PA y/o ELA y/o ETA \geq 1250		PA \geq 1900 y/o ELA \geq 1500 y/o ETA \geq 1900	
		\geq 1	\geq 2	\geq 1	\geq 2	\geq 1	\geq 2
No (n=99)	8(8,1)	31(31,3)	10(10,1)	13(13,1)	1(1,0)	8(8,1)	0
Sí (n=17)	11(64,7)	17(100)	15(88,2)	15(88,2)	12(70,6)	15(88,2)	10(58,8)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	48(41,4)	25(21,6)	28(24,1)	13(11,2)	23(18,8)	10(8,6)
S	64,7 (41,3-82,7)	100 (81,6-100)	88,2 (65,7-96,7)	88,2 (65,7-96,7)	70,6 (46,9-86,7)	88,2 (65,7-96,7)	58,8 (36,0-78,4)
E	91,9 (84,9-95,8)	68,7 (59,0-77,0)	88,9 (82,4-94,4)	86,9 (78,8-92,2)	99,0 (94,0-99,8)	91,9 (84,9-95,8)	100 (96,3-100)
VPP	57,9 (36,3-76,9)	35,4 (23,4-49,6)	60,0 (40,7-76,6)	53,6 (35,8-70,5)	92,3 (66,7-98,6)	65,2 (44,9-81,2)	100 (72,2-100)
VPN	93,8 (87,2-97,1)	100 (94,7-100)	97,8 (92,3-99,4)	97,7 (92,1-99,4)	95,1 (89,0-97,9)	97,8 (92,5-99,4)	93,4 (87,0-96,8)
Ex	87,9 (80,8-92,7)	73,3 (64,6-80,5)	89,7 (82,8-94,0)	87,1 (79,8-92,0)	94,8 (89,2-97,6)	91,4 (84,9-95,3)	94,0 (88,1-97,0)
p	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$

¹ Sin colonización crónica = grupo 1+2+3+4; Con colonización crónica = grupo 5. Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo. N° de pacientes (% respecto al total de cada grupo) con resultados positivos a 1 o más antígenos (\geq 1) y a 2 o más antígenos (\geq 2).

Utilizando el punto de corte crónico se obtienen unos resultados mejores que los obtenidos únicamente mediante el cultivo para todos los indicadores con una especificidad igual. Utilizando el mismo criterio con los puntos de corte 1/1250, que el manual de la técnica considera positivo para la colonización crónica, y 1/500, considerado como dudoso para la misma finalidad, se obtienen valores de exactitud (87,1% y 73,3% respectivamente) y especificidad (86,9% y 68,7%) peores que los obtenidos mediante el cultivo o el punto de corte crónico (PA \geq 1/1900 y/o ELA \geq 1/1500 y/oETA \geq 1/1900).

En el caso del punto de corte crónico al valorar únicamente como positivas para el diagnóstico de la colonización crónica las muestras con anticuerpos frente al menos dos antígenos, la exactitud (94,0%), la especificidad (100%) y el VPP (100%) aumentan pero a costa de una pérdida importante de sensibilidad que disminuye desde el 88,2% hasta el 58,8%. Para los puntos de corte 1/500 y 1/1250, la exactitud mejora si se valoran como positivas las muestras con anticuerpos frente al menos dos de los antígenos y son mejores para el punto de corte 1/1250. En este caso, la sensibilidad disminuye hasta al 70,6%, pero la especificidad aumenta hasta el 99,0% y se obtiene el mejor valor de exactitud (94,8%). En este último caso el VPP es el 92,3% muy por encima del que se obtiene únicamente con el cultivo, que es del 57,9%.

En los muestras con un resultado de cultivo negativo (Tabla-4.2.3.2.6), los resultados de las técnicas serológicas tanto individualmente en el caso de la detección de anticuerpos anti ETA a títulos $\geq 1/1900$ como combinadas a títulos $\geq 1/1250$ o utilizando el punto de corte crónico ($PA \geq 1900$ y/o $ELA \geq 1500$ y/o $ETA \geq 1900$) se asocian estadísticamente con el diagnóstico de colonización crónica ($p < 0,001$).

En muestras con un resultado de cultivo positivo los resultados son peores ($p < 0,05$) pero también existe relación con el diagnóstico de colonización crónica por *P.aeruginosa* (Tabla-4.2.3.2.6), excepto cuando se utilizan las técnicas serológicas combinadas y se valora como positivas las muestras con anticuerpos positivos a títulos $\geq 1/1250$, recomendado por el manual de la técnica, frente a 1 o más antígenos.

Tabla-4.2.3.2.6. Relación entre colonización crónica por *P.aeruginosa* y el resultado de las distintas variables según resultado del cultivo

<i>Cultivo</i>	<i>ETA $\geq 1/1900$</i>	<i>PA y/o ELA y/o ETA $\geq 1/1250$¹</i>		<i>PA ≥ 1900 y/o ELA ≥ 1500 y/o ETA $\geq 1900$¹</i>	
		<i>POS $\geq 1$²</i>	<i>POS $\geq 2$²</i>	<i>POS $\geq 1$²</i>	<i>POS $\geq 2$²</i>
<i>NEGATIVO</i>	<i>Si ($p < 0,01$)</i>	<i>Si ($p < 0,001$)</i>	<i>Si ($p < 0,001$)</i>	<i>Si ($p < 0,001$)</i>	<i>Si ($p < 0,001$)</i>
<i>POSITIVO</i>	<i>Si ($p < 0,05$)</i>	<i>NO</i>	<i>Si ($p < 0,05$)</i>	<i>Si ($p < 0,05$)</i>	<i>Si ($p < 0,05$)</i>

¹ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo.

² Anticuerpos positivos frente a 1 o más antígenos (POS ≥ 1) y a 2 o más antígenos (POS ≥ 2).

4.2.4. Comparación entre detección del DNA, anticuerpos específicos y cultivo en el diagnóstico de colonización por *P.aeruginosa*.

En primer lugar se han evaluado las técnicas de detección de anticuerpos y DNA con los mejores resultados para el diagnóstico de la colonización por *P.aeruginosa*. Las técnicas evaluadas se detallan en la Tabla-4.2.4.1.

Tabla 4.2.4.1. Técnicas evaluadas y criterios de positividad utilizados para las técnicas de detección de anticuerpos y del DNA de *P.aeruginosa*

Técnicas para el diagnóstico colonización por <i>P.aeruginosa</i>	
Detección DNA	-PCRgyrB \geq 35 UFC/ml
Detección anticuerpos	-ELA \geq 1/240 ¹ -Punto corte COLONIZADO ²
Pruebas combinadas	-ELA \geq 1/240 y/o PCRgyrB \geq 35 -Punto corte COLONIZADO y PCRgyrB \geq 35 ³

¹ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo.

² Punto corte COLONIZADO: Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos, utilizando los puntos de corte individuales PA \geq 1/180, ELA \geq 1/240 y ETA \geq 1/800. Se ha considerado como positivo a partir de 1 o más técnicas positivas (\geq 1) o a partir de 2 o más (\geq 2).

³ Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos y la técnica de PCRgyrB de *P.aeruginosa*, utilizando el punto de corte \geq 35 UFC/ml. Se ha considerado como positivo a partir de 1 o más técnicas positivas (\geq 1) o a partir de 2 o más (\geq 2) o a partir de 3 o más.

Los resultados obtenidos por estas técnicas se han correlacionado con los resultados del cultivo y también entre sí. Todas las correlaciones son significativas $p < 0,001$.

En el caso de la PCR gyrB \geq 35UFC/ml, la correlación con los resultados del cultivo es del 82,8%. La correlación de la PCR con la detección de anticuerpos anti-ELA a títulos \geq 1/240 es de 81,9%.

Cuando se utilizan los resultados de los tres antígenos combinados utilizando el punto de corte COLONIZADO (PA \geq 1/180, ELA \geq 1/240 y ETA \geq 1/800) y se consideran positivas

las muestras con anticuerpos como mínimo frente a un solo antígeno, la correlación entre serología y PCR es del 81,0%. Cuando las muestras se consideran positivas a partir de 2 o más antígenos, es del 84,5%.

La correlación entre cultivo y detección de anticuerpos anti-ELA a títulos $\geq 1/240$ es del 78,4%. Cuando se valora la detección de anticuerpos utilizando el punto de corte COLONIZADO y se consideran positivas las muestras con anticuerpos frente a 1 o más antígenos la correlación con el cultivo es del 70,1%. Cuando se consideran positivas las muestras con anticuerpos frente a un mínimo de 2 antígenos, es del 79,3%.

En las tablas que se exponen a continuación se han comparado los resultados obtenidos con cada técnica individualmente y con las técnicas combinadas entre sí. También se han valorado los resultados cuando se añaden al resultado del cultivo. El resultado de cultivo aislado tiene sensibilidad baja (44,2%) y la exactitud (79,1%) y VPN (75,3%) son moderados. La especificidad y el VPP descienden en todas las técnicas respecto al cultivo puesto que éste tiene para ambos parámetros un valor del 100%. Esto es debido a que el cultivo es la técnica utilizada para definir el estado de colonización y por tanto los valores de especificidad y VPP son los máximos.

En las tablas no se muestran los resultados de la combinación de la PCR_{gyrB} ≥ 35 UFC/ml con el cultivo ya que no varían respecto a los resultados de la técnica de PCR individualmente puesto que todas las muestras positivas por cultivo lo fueron también por PCR_{gyrB}. En todas las tablas, las muestras de pacientes colonizados se han separado en dos grupos según tuvieran el resultado del cultivo negativo (24) o positivo (19) para poder valorar mejor los resultados de cada una de las técnicas en estos dos grupos.

En la Tabla-4.2.4.2, los resultados obtenidos con el antígeno ELA para identificar colonización, utilizando como punto de corte el título 1/240, se comparan con los resultados que se obtienen con la PCR_{gyrB} ≥ 35 UFC y con el cultivo. Se han valorado las técnicas individualmente, combinadas entre sí y con el cultivo

Tabla-4.2.4.2. Diagnóstico de la colonización por *P.aeruginosa*. Resultados obtenidos con las técnicas de PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC/ml y detección de anticuerpos anti-ELA $\geq 1/240$, tanto aisladas como combinadas entre sí y con el cultivo

Colonización por <i>P.aeruginosa</i> ^{1, 2}	Cultivo positivo	PCR $_{gyrB} \geq 35$	ELA $\geq 1/240$	PCR $_{gyrB} \geq 35$ y/o ELA $\geq 1/240$	Cultivo pos y/o ELA $\geq 1/240$	Cultivo pos y/o PCR $_{gyrB} \geq 35$ y/o ELA $\geq 1/240$	
						Pos ≥ 1	Pos ≥ 2
No (n=73)	0(0,0)	2(2,7)	9(12,3)	10(13,7)	9(12,3)	10(13,7)	1(1,4)
Si (n=24)	0(0,0)	18(75,0)	14(58,3)	21(87,5)	14(58,3)	21(87,5)	11(45,8)
Si (n=19)	19(100)	19(100)	17(89,5)	19(100)	19(100)	19(100)	19(100)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	39(33,6)	40(34,5)	50(43,1)	42(36,2)	50(43,1)	39(33,6)
S	44,2 (30,4-58,9)	86,0 (72,7-86,2)	72,1 (57,3-83,3)	93,0 (81,4-97,6)	76,7 (62,3-86,8)	93,0 (81,4-97,6)	69,7 (54,9-81,4)
E	100 (95,0-100)	97,3 (90,5-99,2)	87,7 (78,2-93,4)	86,3 (76,6-92,4)	87,7 (78,2-93,4)	86,3 (76,6-92,4)	98,6 (92,6-99,8)
VPP	100 (83,2-100)	94,9 (83,1-98,6)	77,5 (62,5-87,7)	80,0 (67,0-88,8)	78,6 (64,1-88,3)	80,0 (67,0-88,8)	96,8 (83,8-99,4)
VPN	75,3 (65,8-82,8)	92,2 (84,0-96,4)	84,2 (74,4-90,7)	95,5 (87,5-98,4)	86,5 (76,9-92,5)	95,5 (87,5-98,4)	84,7 (75,6-90,8)
Ex	79,3 (71,1-85,7)	93,1 (87,0-96,5)	81,9 (73,9-87,8)	88,8 (81,8-93,3)	83,6 (75,8-89,3)	88,8 (81,8-93,3)	87,9 (80,8-92,7)
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹ Sin colonización = grupo 1+2+3; Con colonización = grupo 4+5. Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).-

³ En el caso de la PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC/ml, la combinación con el cultivo no varía los resultados ya que todas las muestras positivas por cultivo lo fueron también para la PCR $_{gyrB}$.

Individualmente, los mejores resultados de sensibilidad (86,0%), VPN (92,2%) y exactitud (93,1%) se obtienen con la PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC/ml. La especificidad (97,3%) y VPP (94,9%) también son los mejores si se exceptúa el cultivo, que como ya se indicó alcanza el 100%. Utilizando los resultados combinados de la técnica de PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC con la detección de anticuerpos anti ELA $\geq 1/240$, la sensibilidad (93,0%) y VPN (95,5%) mejoran. Por el contrario, la exactitud (88,8%), VPP (80,0%) y especificidad (86,3%) disminuyen. La exactitud de todas las técnicas individualmente o combinadas sigue siendo más alta que la del cultivo valorada individualmente (79,3%).

Cuando el resultado del cultivo es positivo, las técnicas individuales, excepto la detección de anticuerpos anti ELA $\geq 1/240$, o combinadas identifican como positivas el 100% de las muestras de pacientes colonizados con cultivo positivo (19 pacientes). Cuando el

resultado del cultivo es negativo, los mejores resultados se obtienen combinando la técnica de PCR $gyrB \geq 35$ UFC con la detección de anticuerpos anti ELA $\geq 1/240$ con lo que se detecta el 87,5% de los pacientes colonizados aunque la especificidad desciende desde el 97,3% de la PCR $gyrB \geq 35$ UFC aislada al 90,4% cuando se combina con la detección de anticuerpos anti ELA $\geq 1/240$.

De igual forma se han comparado los resultados obtenidos con la serología cuando se utiliza el punto de corte COLONIZADO (PA ≥ 180 y/o ELA ≥ 240 y/o ETA ≥ 800) y se valora la positividad acumulada frente a uno o dos de los tres antígenos. También se ha valorado cuando se combinan con el cultivo y se valora la positividad acumulada frente a uno, dos o tres pruebas. Los resultados se exponen en la Tabla-4.2.4.3.

Tabla-4.2.4.3. Resultados obtenidos para la colonización por *P.aeruginosa* con las técnicas de detección de anticuerpos utilizando el punto de corte COLONIZADO⁴ y la de PCR $gyrB \geq 35$ UFC/muestra tanto aisladas como combinadas entre sí.

Colonización por <i>P.aeruginosa</i> ^{1,2}	Cultivo positivo	Pto. corte COLONIZADO ^{3,4}		Cultivo positivo y/o Pto. Corte COLONIZADO ^{3,4}		
		Pos ≥ 1	Pos ≥ 2	Pos ≥ 1	Pos ≥ 2	Pos ≥ 3
No (n=73)	0(0,0)	14(19,2)	7(9,6)	14(19,2)	7(9,6)	3(4,1)
Sí (n=24)	0(0,0)	19(79,2)	15(62,5)	19(79,2)	15(62,5)	10(41,7)
Sí (n=19)	19(100)	18(94,7)	17(89,5)	19(100)	18(94,7)	17(89,5)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	51(44,0)	39(33,6)	52(44,8)	40(34,5)	30(25,9)
S	44,2 (30,4-58,9)	86,0 (72,7-94,7)	74,4 (59,8-85,1)	88,4 (75,5-94,9)	76,7 (62,3-86,8)	62,8 (47,9-75,6)
E	100 (95,0-100)	80,8 (70,3-88,2)	90,4 (81,5-95,3)	80,8 (70,3-88,2)	90,4 (81,5-95,3)	95,9 (88,6-98,6)
VPP	100 (83,2-100)	72,5 (59,1-82,9)	82,1 (67,3-91,0)	73,1 (59,7-83,2)	82,5 (68,0-91,3)	90,0 (74,4-95,5)
VPN	75,3 (65,8-82,8)	90,8 (81,3-95,7)	85,7 (76,2-91,8)	92,2 (83,0-96,6)	86,8 (77,4-92,7)	81,4 (71,9-88,2)
Ex	79,3 (71,1-85,7)	82,8 (74,9-88,6)	84,5 (76,2-90,0)	83,6 (75,8-89,3)	85,3 (77,8-90,6)	83,6 (75,8-89,3)
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Sin colonización = grupo 1+2+3; Con colonización = grupo 4+5. Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica. N^o muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³ Pto. corte COLONIZADO: PA ≥ 180 y/o ELA ≥ 240 y/o ETA ≥ 800

⁴ Positividad acumulada frente a una, dos o tres técnicas

Los resultados de la serología utilizando el punto de corte COLONIZADO son iguales o peores que los que se obtienen con la PCR_{gyrB} ≥ 35UFC individualmente. Si a los resultados del cultivo se le añaden los de la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos, mejora la sensibilidad (88,4%) con respecto a los resultados individuales de la PCR_{gyrB} ≥ 35UFC (86,0%) pero sólo cuando se consideran positivos los pacientes con 1 o más pruebas positivas. El resto de los indicadores son iguales o peores y tampoco mejoran al considerar positivas las muestras con 2 o más y 3 o más técnicas positivas.

En la Tabla-4.2.4.4 se comparan los resultados para identificar la colonización cuando los resultados de la serología, utilizando el punto de corte COLONIZADO, se combinan con los resultados de la PCR_{gyrB} ≥ 35UFC/ml. También se muestran los resultados cuando se combinan estas dos técnicas con el cultivo.

Tabla-4.2.4.4. Resultados obtenidos para la colonización por *P.aeruginosa* con las técnicas de detección de anticuerpos utilizando el punto de corte COLONIZADO⁴ y la de PCR_{gyrB} ≥ 35UFC/ml tanto aisladas como combinadas entre sí y con el cultivo.

Colonización por <i>P.aeruginosa</i> ^{1,2}	Cultivo positivo	PCR _{gyrB} ≥ 35 UFC/ml y/o Pto. corte COLONIZADO ^{3,4}			Cultivo positivo y/o PCR _{gyrB} ≥ 35 UFC/ml y/o pto. corte COLONIZADO ^{3,4}		
		Pos ≥ 1	Pos ≥ 2	Pos ≥ 3	Pos ≥ 1	Pos ≥ 2	Pos ≥ 3
No (n=73)	0(0,0)	15(20,5)	7(9,6)	4(5,5)	15(20,5)	7(9,6)	4(5,5)
Sí (n=24)	0(0,0)	22(91,7)	18(75,0)	14(58,3)	22(91,7)	18(75,0)	14(58,3)
Sí (n=19)	19(100)	19(100)	18(94,7)	17(89,5)	19(100)	19(100)	18(94,7)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	56(48,3)	43(37,1)	35(30,2)	56(48,3)	44(37,9)	36(30,0)
S	44,2 (30,4-58,9)	95,3 (84,5-98,7)	83,7 (70,0-91,9)	72,1 (57,3-83,3)	95,3 (84,5-98,7)	86,0 (72,7-93,4)	74,4 (59,8-85,1)
E	100 (95,0-100)	79,5 (68,8-87,1)	90,4 (81,5-95,3)	94,5 (86,7-97,8)	79,5 (68,8-87,1)	90,4 (81,5-95,3)	94,5 (86,7-97,8)
VPP	100 (83,2-100)	73,2 (60,4-83,0)	83,7 (70,0-91,9)	88,6 (74,0-95,5)	73,2 (60,4-83,0)	84,1 (70,6-92,1)	88,9 (74,7-95,6)
VPN	75,3 (65,8-82,8)	96,7 (88,6-99,1)	90,4 (81,5-95,3)	85,2 (75,9-91,3)	96,7 (88,6-99,1)	91,7 (83,0-96,1)	86,3 (77,0-92,1)
Ex	79,3 (71,1-85,7)	85,3 (77,8-90,6)	87,9 (80,8-92,7)	86,2 (78,8-91,3)	85,3 (77,8-90,6)	88,8 (81,8-93,3)	87,1 (79,8-92,0)
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹ Sin colonización = grupo 1+2+3; Con colonización = grupo 4+5. Grupo-1, muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³ Pto. corte COLONIZADO: PA ≥ 180 y/o ELA ≥ 240 y/o ETA ≥ 800

⁴ Positividad acumulada frente a una, dos o tres técnicas.

Combinando los resultados de serología, utilizando el punto de corte COLONIZADO y $PCR_{gyrB} \geq 35UFC$ y considerando positivos los casos con una o más pruebas positivas, la sensibilidad (95,3%) y el VPN (96,7%) mejoran con respecto a los resultados individuales de la $PCR_{gyrB} \geq 35UFC$ (86,0% y 92,2%, respectivamente). Por el contrario, la exactitud (85,3%), especificidad (79,5%) y VPP (73,2%) son menores.

Cuando el resultado del cultivo es positivo (19 del total de 43 muestras de pacientes colonizados), tanto la técnica de $PCR_{gyrB} \geq 35UFC$ individualmente como combinada con la serología, identifican el 100% de los casos cuando se valora a partir de una prueba positiva.

Cuando el resultado del cultivo es negativo (24 del total de 43 muestras de pacientes colonizados), los mejores resultados se obtienen combinando la técnica de $PCR_{gyrB} \geq 35UFC/ml$ con la detección de anticuerpos utilizando el punto de corte COLONIZADO y valorando a partir de una prueba positiva, con lo que se identificarían el 91,7% de los casos de colonización. Sin embargo, la especificidad desciende desde el 97,3% de la $PCR_{gyrB} \geq 35UFC$ aislada al 79,5% cuando se combina con la detección de anticuerpos.

Cuando se combinan los resultados de cultivo, serología, utilizando el punto de corte COLONIZADO, y $PCR_{gyrB} \geq 35UFC/ml$, y se valora como colonización el resultado de una o más pruebas positivas, se identifican el 100% de los pacientes colonizados con cultivo positivo y el 91,7% de los pacientes colonizados con cultivo negativo aunque la especificidad desciende desde el 97,3% con los resultados de la $PCR_{gyrB} \geq 35UFC$ individualmente al 79,5% cuando se incluyen los resultados de la serología.

4.2.5. Comparación entre detección del DNA, anticuerpos específicos y cultivo en el diagnóstico de colonización crónica por *P.aeruginosa*.

Se han comparado las técnicas de detección de anticuerpos y DNA con los mejores resultados para el diagnóstico de la colonización crónica por *P.aeruginosa*. Las técnicas evaluadas se detallan en la Tabla-4.2.5.1.

Tabla-4.2.5.1. Técnicas evaluadas y criterios de positividad utilizados para las técnicas de detección de anticuerpos y del DNA de *P.aeruginosa*

Técnicas para el diagnóstico colonización crónica por <i>P.aeruginosa</i>	
Detección DNA	-PCRgyrB \geq 5000 UFC/ml
Detección anticuerpos ¹	-ETA \geq 1/1900 ¹ -Pto. corte CRÓNICO ² -Pto. corte 1/1250
Pruebas combinadas ^{2,3}	-ETA \geq 1/1900 y/o PCRgyrB \geq 5000 UFC/ml -Ptos. corte CRÓNICO y PCRgyrB \geq 5000 UFC/ml -Ptos. corte 1/2500 y PCRgyrB \geq 5000 UFC/ml

¹ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo.

² Punto corte CRONICO: Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos, utilizando los puntos de corte individuales PA \geq 1/1900 y/o ELA \geq 1/1500 y/o ETA \geq 1/1900. Se ha considerado como positivo a partir de 1 o más técnicas positivas (\geq 1) o a partir de 2 o más (\geq 2).

³ Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos y la técnica de PCRgyrB de *P.aeruginosa*, utilizando el punto de corte \geq 35 UFC/ml. Se ha considerado como positivo a partir de 1, 2 o 3 técnicas positivas.

Los resultados obtenidos por estas técnicas se han correlacionado con los resultados del cultivo y también entre sí. Todas las correlaciones son significativas (p<0,001).

En el caso de la PCR gyrB \geq 5000 UFC/ml, la correlación con los resultados del cultivo es del 88,8%. La correlación entre el cultivo y la detección de anticuerpos anti-ETA a títulos \geq 1/1900 es de 87,1%. Cuando se valoran los resultados de los tres antígenos combinados utilizando el punto de corte 1/1250 (PA \geq 1/1250, ELA \geq 1/1250 y ETA \geq 1/1250) y se consideran positivos los pacientes con anticuerpos como mínimo frente a un antígeno, la correlación entre cultivo y serología es del 80,2%. Cuando las muestras se consideran

positivas a partir de 2 o más antígenos, es del 84,5%. Cuando las muestras se consideran positivas a partir de 3 o más antígenos, es del 86,2%.

Cuando se utilizan los resultados de los tres antígenos combinados empleando el punto de corte CRÓNICO ($PA \geq 1/1900$, $ELA \geq 1/1500$ y $ETA \geq 1/1900$) y se consideran positivas las muestras con anticuerpos como mínimo frente a un solo antígeno, la correlación entre cultivo y serología es del 83,8%. Cuando los pacientes se consideran positivos a partir de 2 o más antígenos o de 3 o más antígenos, es del 87,1%.

También se ha calculado la correlación entre la PCR $gyrB \geq 5000$ UFC/ml y la detección de anticuerpos anti-ETA a títulos $\geq 1/1900$ que es del 87,9%. Cuando se valoran los resultados de los tres antígenos combinados utilizando el punto de corte 1/1250 ($PA \geq 1/1250$, $ELA \geq 1/1250$ y $ETA \geq 1/1250$) y se consideran positivos las muestras con anticuerpos como mínimo frente a un solo antígeno, la correlación entre serología y PCR $gyrB \geq 5000$ UFC, es del 81,0%. Cuando las muestras se consideran positivas a partir de 2 o más antígenos, es del 90,5%. Cuando las muestras se consideran positivas a partir de 3 o más antígenos, es del 87,1%.

Cuando se utilizan los resultados de los tres antígenos combinados utilizando el punto de corte CRÓNICO ($PA \geq 1/1900$, $ELA \geq 1/1500$ y $ETA \geq 1/1900$) y se consideran positivas las muestras con anticuerpos como mínimo frente a un antígeno, la correlación entre serología y PCR $gyrB \geq 5000$ UFC, es del 85,3%. Cuando las muestras se consideran positivas a partir de 2 o más antígenos es del 89,7% y a partir de 3 o más antígenos, es del 86,2%.

En las tablas que se exponen a continuación se han comparado los resultados obtenidos con cada técnica individualmente y con las técnicas combinadas entre sí. También se han valorado los resultados cuando se tiene en cuenta el resultado del cultivo. En todas las tablas, cada uno de los dos grupos, con y sin colonización crónica (17 y 99 casos, respectivamente) se han separado a su vez según tuvieran el resultado del cultivo negativo o positivo para poder valorar mejor los resultados de cada una de las técnicas en estos cuatro grupos de pacientes.

En la Tabla-4.2.5.2 se muestran los resultados obtenidos con el antígeno ETA utilizando como punto de corte un título $\geq 1/1900$ comparándolos con la técnica de $PCR_{gyrB} \geq 5000$ UFC/ml tanto individualmente como combinadas entre sí.

Tabla-4.2.5.2. Resultados obtenidos para el diagnóstico de la colonización crónica por *P.aeruginosa* con la detección de anticuerpos frente al antígeno ETA al título $\geq 1/1900$ y la $PCR_{gyrB} \geq 5000$ UFC/ml individualmente o combinadas entre sí.

Colonización crónica <i>P.aeruginosa</i>^{1,2}	Cultivo positivo	PCR_{gyrB} ≥ 5000	ETA^3 $\geq 1/1900$	$ETA^3 \geq 1/1900$ y/o $PCR_{gyrB} \geq 5000$
No (n=91)	0(0)	1(1,1)	2(2,2)	3(3,3)
No (n=8)	8(100)	4(50,0)	1(12,5)	4(50,0)
Sí (n=6)	0(0)	5(83,3)	3(50,0)	6(100)
Sí (n=11)	11(100)	8(72,7)	8(72,7)	10(90,9)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	18(15,5)	14(12,1)	23(19,8)
S	64,7 (41,3-82,7)	76,5 (52,7-90,4)	64,7 (41,3-82,7)	94,1 (73,0-99,0)
E	91,9 (84,9-95,8)	94,9 (88,7-97,8)	97,0 (91,5-99,0)	92,9 (86,1-96,5)
VPP	57,9 (36,3-76,9)	72,2 (49,1-87,1)	78,6 (52,4-92,4)	69,6 (49,1-84,4)
VPN	93,8 (87,2-97,1)	95,9 (90,0-98,4)	94,1 (87,8-97,3)	98,9 (94,2-99,8)
Ex	87,9 (80,8-92,7)	92,2 (85,9-95,9)	92,2 (85,9-95,9)	93,1 (87,0-96,5)
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Sin colonización crónica = grupo 1+2+3+4; Con colonización crónica = grupo 5. Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo). N° Muestras con resultados positivos a 1 o más antígenos (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³ N° positivos a 1 o más (≥ 1), 2 o más (≥ 2) técnicas. ETA= Exotoxina A

Un resultado de cultivo aislado tiene sensibilidad (64,7%) y VPP (57,9%) bajos para identificar la colonización crónica. Cuando se utilizan de forma individual la $PCR_{gyrB} \geq 5000$ UFC/ml o la determinación del título de anticuerpos anti-ETA $\geq 1/1900$, la sensibilidad aumenta ligeramente o queda igual (76,5% y 64,7%) mientras que el VPP (72,2% y 78,6%) son más altos que los del cultivo aislado. Combinando ambas técnicas sensibilidad (94,1%), VPP (69,6%) y exactitud (93,1%) son más altos que el cultivo aislado.

En la Tabla-4.2.5.3 se muestran los resultados de la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos, PA, ELA y ETA empleando el punto de corte recomendado por el manual de la técnica para el diagnóstico de la colonización crónica (título $\geq 1/1250$) y combinando los resultados para los tres antígenos. También se muestran los resultados cuando se combinan con la técnica de PCRgyrB ≥ 5000 .

Tabla 4.2.5.3. Resultados obtenidos para el diagnóstico de la colonización crónica por *P.aeruginosa* con las técnicas serológicas utilizando el punto de corte $\geq 1/1250$ y combinadas con la PCRgyrB ≥ 5000 UFC/ml.

Colonización crónica <i>P.aeruginosa</i> ^{1,2}	Cultivo positivo	<i>PA</i> ≥ 1250 y/o <i>ELA</i> ≥ 1250 y/o <i>ETA</i> ≥ 1250 ³		<i>PCRgyrB</i> ≥ 5000 y/o <i>PA</i> ≥ 1250 y/o <i>ELA</i> ≥ 1250 y/o <i>ETA</i> ≥ 1250 ³	
		<i>POS</i> ≥ 1	<i>POS</i> ≥ 2	<i>POS</i> ≥ 2	<i>Pos</i> ≥ 3
<i>No</i> (n=91)	0(0)	10(11,0)	1(1,1)	1(1,1)	0 (0)
<i>No</i> (n=8)	8(100)	3(37,5)	0(0)	1(12,5)	0(0)
<i>Sí</i> (n=6)	0(0)	6(100)	5(83,3)	6(100)	4(66,7)
<i>Sí</i> (n=11)	11(100)	9(81,8)	7(63,6)	7(63,6)	7(63,6)
TOTAL(n=116)	19(16,4)	28(24,1)	13(11,2)	15(12,9)	11(9,5)
<i>S</i>	64,7 (41,3-82,7)	88,2 (65,7-96,7)	70,6 (46,9-86,7)	76,5 (52,7-90,4)	64,7 (41,3-82,7)
<i>E</i>	91,9 (84,9-95,8)	86,9 (78,8-92,2)	99,0 (94,0-99,8)	98,0 (92,9-99,4)	100 (96,3-100)
<i>VPP</i>	57,9 (36,3-76,9)	53,6 (35,8-70,5)	92,3 (66,7-98,6)	86,7 (62,1-96,3)	100 (74,1-100)
<i>VPN</i>	93,8 (87,2-97,1)	97,7 (92,1-99,4)	95,1 (89,0-97,9)	96,0 (90,3-98,4)	94,3 (88,1-97,4)
<i>Ex</i>	87,9 (80,8-92,7)	87,1 (79,8-92,0)	94,8 (89,2-97,6)	94,8 (89,2-97,6)	94,8 (89,2-97,6)
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹ Sin colonización crónica = grupo 1+2+3+4; Con colonización crónica = grupo 5. Grupo-1, 24 muestras de pacientes nunca colonizados por *P.aeruginosa*; Grupo-2, 27 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización inicial; Grupo-3, 22 muestras de pacientes no colonizados con antecedentes de colonización intermitente o crónica; Grupo-4, 26 muestras de pacientes con colonización intermitente. Grupo-5, 17 muestras de pacientes con colonización crónica. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo). N° Muestras con resultados positivos a 1 o más antígenos (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo N° positivos a 1 o más (≥ 1), 2 o más (≥ 2), 3 o más (≥ 3) técnicas.

Los resultados de la detección de anticuerpos a títulos $\geq 1/1250$ combinando los tres antígenos, y considerando positivos los pacientes con al menos dos de ellos positivos, son mejores que el cultivo para identificar la colonización crónica. Si estos resultados se comparan también con los de la $PCR_{gyrB} \geq 5000$ UFC/ml, el VPP de la detección de anticuerpos (92,3%) es mucho mayor que el cultivo (57,9%) o la PCR (72,2%). La sensibilidad de la detección de anticuerpos (70,6%) es intermedia entre la del cultivo (64,7%) y la de la $PCR_{gyrB} \geq 5000$ (76,5%).

Cuando se combinan los resultados de la $PCR_{gyrB} \geq 5000$ UFC/ml con la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos, PA, ELA y ETA, utilizando como puntos de corte el título $\geq 1/1250$ y se consideran como colonización crónica un mínimo de dos o tres técnicas positivas se obtiene el mismo valor de exactitud (94,8%) en los dos casos. Los mejores valores de sensibilidad (76,5%) y VPN (96,0%) se obtienen con un mínimo de 2 de las cuatro técnicas positivas y la mejor especificidad (100%) y VPP (100%) con un mínimo de tres.

Los resultados de la detección del título de anticuerpos obtenidos con los tres antígenos utilizando como puntos de corte los calculados mediante curvas ROC (Punto de corte CRÓNICO, $PA \geq 1/1900$ y/o $ELA \geq 1/1500$ y/o $ETA \geq 1/1900$) se exponen en la Tabla-4.2.5.4. También se muestran los resultados obtenidos combinando la detección de anticuerpos con la técnica de $PCR_{gyrB} \geq 5000$ UFC/ml.

Los resultados de la detección de anticuerpos combinando los tres antígenos y utilizando el punto de corte crónico son mejores que el cultivo para identificar la colonización crónica. Los mejores resultados de sensibilidad (88,2%) y VPN (97,8%) se consiguen valorando como colonización crónica al menos una de las pruebas positivas. Si se consideran como colonización crónica dos o más de ellas positivas, se obtienen los mejores resultados de especificidad (100%) pero a costa de una sensibilidad baja (58,8%).

Tabla-4.2.5.4. Resultados obtenidos para el diagnóstico de la colonización crónica por *P.aeruginosa* con la detección de anticuerpos utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROCy combinadas con los resultados de la PCR $gyrB \geq 5000$ UFC/ml.

Colonización crónica <i>P.aeruginosa</i> ^{1,2}	Cultivo positivo	<i>PA</i> ≥ 1900 y/o <i>ELA</i> ≥ 1500 y/o <i>ETA</i> ≥ 1900 ³		<i>PCRgyrB</i> ≥ 5000 ³ y/o <i>PA</i> ≥ 1900 y/o <i>ELA</i> ≥ 1500 y/o <i>ETA</i> ≥ 1900	
		<i>POS</i> ≥ 1	<i>POS</i> ≥ 2	<i>POS</i> ≥ 2	<i>POS</i> ≥ 3
<i>No</i> (n=91)	0(0)	6(6,6)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>No</i> (n=8)	8(100)	2(25)	0(0)	1(12,5)	0(0)
<i>Sí</i> (n=6)	0(0)	6(100)	3(50,0)	6(100)	2(25)
<i>Sí</i> (n=11)	11(100)	9(81,8)	7(63,6)	7(63,6)	7(63,6)
TOTAL (n=116)	19(16,4)	23(18,8)	10(8,6)	14(12,1)	9(7,8)
<i>S</i>	64,7 (41,3-82,7)	88,2 (65,7-96,7)	58,8 (36,0-78,4)	76,5 (52,7-90,4)	52,9 (52,7-90,4)
<i>E</i>	91,9 (84,9-95,8)	91,9 (84,9-95,8)	100 (96,3-100)	99,0 (88,7-97,8)	100 (96,3-100)
<i>VPP</i>	57,9 (36,3-76,9)	65,2 (44,9-81,2)	100 (72,2-100)	92,9 (68,5-98,7)	100 (70,1-100)
<i>VPN</i>	93,8 (87,2-97,1)	97,8 (92,5-99,4)	93,4 (87,0-96,8)	96,1 (90,3-98,5)	92,5 (85,9-96,2)
<i>Ex</i>	87,9 (80,8-92,7)	91,4 (84,9-95,3)	94,0 (88,1-97,0)	95,7 (90,3-98,1)	93,1 (87,0-96,5)
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹ No colonizados crónicamente = grupo 1+2+3+4; Colonizados crónicamente = grupo 5

² S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo. CRONICO: *PA* $\geq 1/1900$ y/o *ELA* $\geq 1/1500$ y/o *ETA* $\geq 1/1900$
Nº positivos a 1 o más (≥ 1), 2 o más (≥ 2), 3 o más (≥ 3) técnicas (porcentaje respecto al total de cada grupo)

Cuando se combinan la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos utilizando el punto de corte CRÓNICO con los resultados de la PCR $gyrB \geq 5000$ y se consideran como colonización crónica un mínimo de 2 de las cuatro pruebas positivas, mejoran la especificidad (99,0%), VPN (96,1%), exactitud (95,7%), y sobre todo el VPP (92,9%) pero no la sensibilidad (76,5%). Teniendo en cuenta los resultados de sensibilidad y especificidad los resultados más equilibrados se obtienen con la detección de anticuerpos, utilizando los puntos de corte seleccionados mediante curvas ROC y considerando como colonización crónica un mínimo de una de las tres pruebas positivas.

Cuando se tiene en cuenta el resultado del cultivo, la relación entre diagnóstico de colonización crónica y los resultados de todas las técnicas, tanto individualmente como combinadas entre sí, es estadísticamente significativa cuando el cultivo es negativo. Por el contrario, cuando el resultado del cultivo es positivo únicamente las técnicas de detección de anticuerpos se asocian estadísticamente al diagnóstico de colonización crónica por *P.aeruginosa* (Tabla-4.2.5.5).

Tabla-4.2.5.5. Relación entre colonización crónica por *P.aeruginosa* y el resultado de las distintas técnicas según resultado del cultivo

<i>Técnica</i> ¹	<i>N° pruebas positivas</i>	<i>Cultivo NEGATIVO</i>	<i>Cultivo POSITIVO</i>
<i>PCRgyrB</i> ≥5000UFC/ ml	<i>POS</i> ≥1	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,001)	<i>NO</i>
<i>ETA</i> ¹ ≥1/1900	<i>POS</i> ≥1	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,01)	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,05)
<i>ETA</i> ¹ ≥1/1900 y/o <i>PCRgyrB</i> ≥5000UFC/ml	<i>POS</i> ≥1	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,001)	<i>NO</i>
<i>PA</i> y/o <i>ELA</i> y/o <i>ETA</i> ≥ 1/1250	<i>POS</i> ≥1	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,001)	<i>NO</i>
	<i>POS</i> ≥2	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,001)	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,05)
<i>PA</i> y/o <i>ELA</i> y/o <i>ETA</i> ≥ 1/1250 y/o <i>PCRgyrB</i> ≥5000UFC	<i>POS</i> ≥2	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,001)	<i>NO</i> ²
	<i>POS</i> ≥3	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,001)	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,05)
<i>PA</i> ≥1900 y/o <i>ELA</i> ≥ 1500 y/o <i>ETA</i> ≥1900	<i>POS</i> ≥1	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,001)	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,05)
	<i>POS</i> ≥2	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,001)	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,05)
<i>PA</i> ≥1900 y/o <i>ELA</i> ≥ 1500 y/o <i>ETA</i> ≥1900 y/o <i>PCRgyrB</i> ≥5000UFC	<i>POS</i> ≥2	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,001)	<i>NO</i> ²
	<i>POS</i> ≥3	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,01)	<i>Sí</i> (<i>p</i> <0,05)

¹ PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo.

² p=0,059

Respecto a la combinación de *PCRgyrB* y detección de anticuerpos, la asociación con el diagnóstico de colonización crónica únicamente es estadísticamente significativa cuando se combinan PCR y detección de anticuerpos frente a los tres antígenos y son positivas un mínimo de tres técnicas. Esto es así utilizando tanto el punto de corte 1/1250 como los puntos de corte calculados mediante curvas ROC (*PA*≥1900 y/o *ELA*≥ 1500 y/o*ETA*≥1900).

4.3. Análisis de las muestras de pacientes con 24 meses de seguimiento analizado

4.3.1. Características de los grupos analizados

Se ha realizado un análisis de los resultados de cultivo, detección del DNA y serología correspondientes a 471 muestras de 68 pacientes que tenían un periodo de seguimiento mínimo de 24 meses. Los criterios para la inclusión de los pacientes fueron los siguientes:

1-Mínimo de 24 meses de seguimiento.

2-Mínimo de 2 muestras anuales de suero para la detección de anticuerpos anti *P.aeruginosa* y exudado faríngeo para la detección del DNA de la bacteria.

3-Mínimo de seguimiento microbiológico habitual de un año previo y posterior a la primera y última muestra analizada en el seguimiento.

Los resultados del seguimiento microbiológico habitual se han utilizado para la clasificación según el estatus de colonización de los 68 pacientes. Se distribuyeron en dos grupos según estos resultados durante los 24 meses de seguimiento:

-Grupo A, 231 muestras pertenecientes a 33 (48,5%) pacientes sin aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo durante los 24 meses de seguimiento analizado.

-Grupo B, 240 muestras pertenecientes a 35 (51,5%) pacientes con algún aislamiento de *P.aeruginosa* en el control microbiológico habitual durante los 24 meses de seguimiento analizado. En este grupo, 15 pacientes (42,9%) tuvieron un único aislamiento, mientras que en 20 (57,1%), *P.aeruginosa* se aisló en 2 o más ocasiones.

De los 68 pacientes, 14 nunca habían estado colonizados por *P.aeruginosa* y 54 tenían antecedentes de algún periodo de colonización previa. De estos últimos, 18 tenían antecedentes de colonización inicial, 33 colonización intermitente y 3 crónica. En el 30,3% de los pacientes de grupo A no existían antecedentes de colonización previa por *P.aeruginosa* frente a solo el 11,4% de los pacientes del grupo B. La distribución de los antecedentes de colonización previa en cada grupo se detalla en la Figura 4.3.1.1. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre ambos grupos.

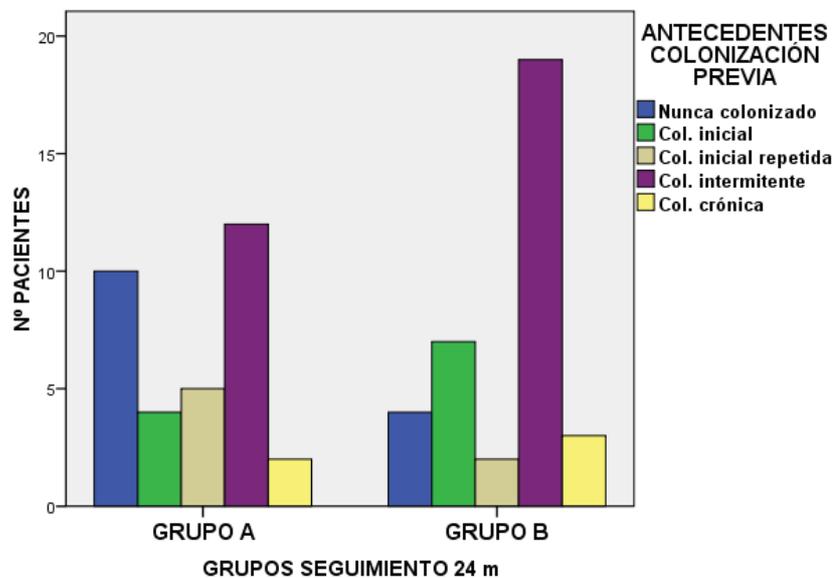


Figura 4.3.1.1. Distribución según los antecedentes de colonización previa por *P.aeruginosa* al inicio del periodo de seguimiento analizado. Grupo A=231 muestras de 33 pacientes sin aislamiento de *P.aeruginosa* y Grupo B= 240 muestras de 35 con aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento. Los pacientes con antecedentes de colonización inicial se han diferenciado en dos categorías según hubieran tenido un solo episodio de colonización inicial o más de uno.

De los 54 pacientes con antecedentes de colonización previa, 19 habían estado colonizados durante los 12 meses previos a la obtención de la primera muestra del periodo de 24 meses de seguimiento analizado, 6 (18,2%) en el grupo A de pacientes sin aislamiento de *P.aeruginosa* y 13 (37,1%) en el grupo B. Respecto a la colonización en los 12 meses posteriores a la última muestra del periodo de seguimiento, 9 (27,3%) pacientes del grupo A se colonizaron frente a 23 (65,7%) del grupo B.

Durante el seguimiento de 24 meses analizado, un total de 30 pacientes (44,1%) cambiaron su estatus de colonización respecto al periodo de 12 meses previo al inicio del seguimiento.

-22 pacientes no colonizados se colonizaron (3 primera colonización inicial y 5 repetida, 12 colonización intermitente y 2 pacientes primero sufrieron un episodio de colonización inicial repetida y luego se colonizaron intermitentemente.

-1 paciente con colonización inicial pasó a crónica.

-1 paciente con colonización inicial tuvo otro episodio de colonización inicial repetida

-6 pacientes colonizados (3 con colonización inicial repetida, 2 intermitente y 1 crónica) dejaron de estarlo.

La distribución según los cambios en el estatus de colonización se detalla en la Tabla 4.3.1.1.

Tabla 4.3.1.1. Cambios en el estatus de colonización de los pacientes de cada grupo

GRUPO¹	Grupo A² (n = 33)	Grupo B² (n = 35)
Estatus de colonización en los 12 m previos al inicio de los 24 meses de seguimiento analizado	10 (30,3%) Nunca col. 17 (51,5%) No col. 6 (18,2%) Sí col. 1 inicial 2 inicial repetida 2 intermitente 1 crónica	4 (11,4%) Nunca col 18 (51,5%) No col 13 (37,1%) Sí Col 2 inicial 10 intermitente 1 crónica
Estatus de colonización en los 24 meses de seguimiento analizado	10 (30,3%) Nunca col. 23 (69,7%) No col.	35 (100%) Sí col 8 inicial 1 inicial repetida 2 inicial repetida e intermitente 22 intermitente 2 crónica
Estatus de colonización en los 12 m posteriores al final de los 24 meses de seguimiento analizado	8 (24,2%) Nunca col 16 (48,4%) No col. 9 (27,4%) Sí col 2 inicial 5 inicial repetida 2 intermitente	12 (34,3%) No col 23 (65,7%) Sí col 5 inicial repetida 15 intermitente 3 crónica

Grupo A=33 pacientes sin aislamiento de *P.aeruginosa* y Grupo B= 35 pacientes con aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado

²Nº pacientes (porcentaje respecto al total de cada grupo)

La distribución de los pacientes de cada grupo respecto al estatus de colonización en los 12 meses anteriores y posteriores al periodo de seguimiento analizado se muestra en la Figura 4.3.1.2. Las diferencias entre el grupo A y B en el número de pacientes colonizados y no colonizados no fueron significativas en el periodo de 12 meses previos pero sí en el periodo de los 12 meses posteriores (p<0,01).

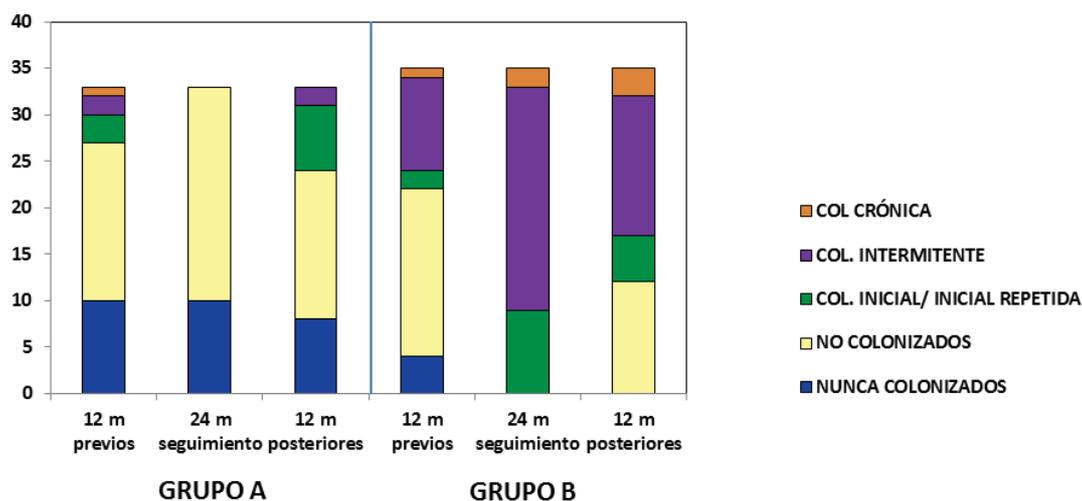


Figura 4.3.1.2. Distribución de los pacientes según el estatus de colonización por *P.aeruginosa* en los 12 meses previos al inicio y en los 12 meses posteriores al final de los 24 meses de seguimiento analizado. Grupo A=31 pacientes sin aislamiento de *P.aeruginosa* y Grupo B= 35 con aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento.

Se ha recogido y valorado las diferencias entre los grupos respecto de algunas características. El total de muestras estudiadas en el seguimiento microbiológico habitual realizado durante los dos años de seguimiento así como el número de muestras positivas a *P.aeruginosa* se detallan en la Tabla 4.3.1.2.

Tabla 4.3.1.2. Distribución de la mediana del total de muestras analizadas y positivas a *P. aeruginosa* en el seguimiento microbiológico habitual durante los 24 meses de seguimiento analizado

<i>Pacientes</i> ¹	<i>Nº MUESTRAS</i> ²	
	<i>TOTALES</i>	<i>POSITIVAS</i>
<i>Grupo A (n = 33)</i>	<i>12 (10/15)</i>	<i>0</i>
<i>Grupo B (n = 35)</i>	<i>14 (12 /18)</i>	<i>2 (1 /5)</i>
<i>TOTAL (n= 68)</i>	<i>13 (10,25 / 17)</i>	<i>1 (0 /2)</i>

¹Grupo A, pacientes sin aislamiento por cultivo de *P.aeruginosa* durante los 2 años de seguimiento. Grupo B pacientes con aislamiento por cultivo de *P.aeruginosa* durante los 2 años de seguimiento.

²Mediana del número de muestras (cuartil 1/cuartil 3)

Naturalmente las diferencias son significativas entre los dos grupos respecto del número de muestras positivas a *P.aeruginosa* en el periodo de seguimiento de dos años ($p < 0,001$), pero no respecto del total de muestras analizadas.

También se recogió la información del tipo de muestra utilizada principalmente (>50%) en el seguimiento microbiológico habitual durante el periodo de seguimiento. La distribución de los pacientes según se hubiera realizado principalmente mediante cultivo de esputo o de exudado faríngeo se muestra en la Tabla 4.3.1.3. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos.

Tabla 4.3.1.3. Distribución del principal tipo de muestra respiratoria cultivada en el seguimiento microbiológico habitual de los pacientes de cada grupo durante los 24 meses de seguimiento analizado

<i>Pacientes</i> ¹	<i>Tipo de muestra</i> ²	
	<i>Exudado faríngeo</i>	<i>Esputo</i>
Grupo A (n = 33)	26 (78,8)	7 (21,2)
Grupo B (n = 35)	23 (65,7)	12 (34,3)
TOTAL (n= 68)	49 (72,1)	19 (27,9)

¹Grupo A, pacientes sin aislamiento por cultivo de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado. Grupo B pacientes con aislamiento por cultivo de *P.aeruginosa* durante los 2 años de seguimiento.

²Nº pacientes (porcentaje respecto al total de pacientes de cada grupo)

La distribución por sexo y edad en el momento de la recogida de las primeras muestras de suero y exudado faríngeo analizadas se presenta en la Tabla 4.3.1.4. Se han incluido 33 niñas y 35 niños, con una media de edad de 6,39 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la distribución por sexo ni por edad.

Tabla 4.3.1.4. Distribución por edad y sexo en cada grupo

<i>Pacientes</i> ¹	<i>Edad</i> ²	<i>Sexo</i> ³	
		<i>Niñas</i>	<i>Niños</i>
Grupo A (n = 33)	6,07 (0-14 / 3,44)	15 (45,5%)	18 (54,5%)
Grupo B (n = 35)	6,70 (0 -15 /4,93)	18 (51,4%)	17 (48,6%)
TOTAL (n= 68)	6,39 (0-15 / 4,25)	33 (48,5%)	35 (51,5%)

¹Grupo A, pacientes sin aislamiento por cultivo de *P.aeruginosa* durante los 2 años de seguimiento. Grupo B pacientes con aislamiento por cultivo de *P.aeruginosa* durante los 2 años de seguimiento.

²En años, promedio (rango/desviación estándar)

³Nº pacientes (porcentaje respecto al total de pacientes de cada grupo)

En el 79,4% de los pacientes, la FQ se había diagnosticado antes del año de edad y las diferencias no fueron significativas entre los grupos A (78,8%) y B (80,0%). El 79,4 % de los 68 pacientes presentaban la delección en la posición F508 en al menos uno de los dos alelos, siendo el 22,1% homocigoto y 57,4% heterocigoto con respecto al total de pacientes. Del

total de pacientes incluidos, 67 (98,5%) tenían una FQ confirmada por la presencia de 2 mutaciones causantes de FQ, según la información disponible en la *Cystic Fibrosis Mutations Database* (www.cfr2.org/faq.php), y/o test del sudor positivo (superior a 60 mmol/L de ClNa). En un paciente el test del sudor era indeterminado con valores entre 40 y 59 mmol/L de ClNa y era portador de dos mutaciones de significado incierto. Las diferencias entre los dos grupos no fueron estadísticamente significativas.

Se ha recogido la situación clínica de los pacientes en el momento de la obtención de la primera muestra incluida en el seguimiento analizado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B en cuanto a la presencia de bronquiectasias (24,2% vs 40,0%) ni al índice de masa corporal ajustado por edad y sexo, que era normal en el 75,0% (75,8% vs 74,3%). Respecto al valor del volumen expiratorio forzado en un segundo (FEV1) en la prueba más cercana a la fecha de obtención de la primera muestra del seguimiento, esta prueba no se había realizado nunca en 30 pacientes pero no existían diferencias significativas en cuanto a la realización de la prueba entre ambos grupos (60,6% vs 51,4%) ni tampoco en la proporción de pacientes con el valor del FEV1 inferior al 80% (10,0% vs 14,3%). Solo un paciente del grupo A tenía una situación clínica grave al inicio del seguimiento, en el 79,4% de los pacientes la situación clínica general era normal o leve (81,8% vs 77,1%) y no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Naturalmente se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre ambos grupos respecto a la proporción de pacientes en los que constaba que habían recibido tratamiento antibiótico con actividad frente a *P.aeruginosa* durante el periodo de seguimiento de 24 meses. Sin embargo, el 54,5% de los pacientes del grupo A habían recibió algún tratamiento con actividad frente a *P.aeruginosa* ya sea solo azitromicina (21,2%) o tratamiento antibiótico específico frente a *P.aeruginosa* (33,3%). En el grupo B todos (100%) habían recibido tratamiento, aunque en un caso solo azitromicina.

4.3.2. Resultados del control microbiológico habitual durante los 24 meses de seguimiento analizado

En la Figura 4.3.2.1 se muestra la distribución de pacientes de cada grupo según el número de muestras totales procesadas por cultivo en el control microbiológico habitual que se había realizado a los pacientes durante el periodo de seguimiento de 24 meses. Aunque el grupo A presenta un mayor porcentaje (18,2%) de pacientes con menos de 10 muestras procesadas respecto al grupo B (9,1%) y éste último un mayor porcentaje (17,1%) de pacientes con más de 20 muestras procesadas respecto al grupo A (6,1%), las diferencias en el número total de cultivos de muestras respiratorias realizados en el seguimiento microbiológico habitual no son estadísticamente significativas. En la mayoría de pacientes, 75,7% en el grupo A y 73,8% en el B, se procesaron entre 10 y 20 muestras por cultivo en el seguimiento microbiológico habitual durante los 24 meses de seguimiento analizado, lo que representa entre 5 y 10 muestras anuales.

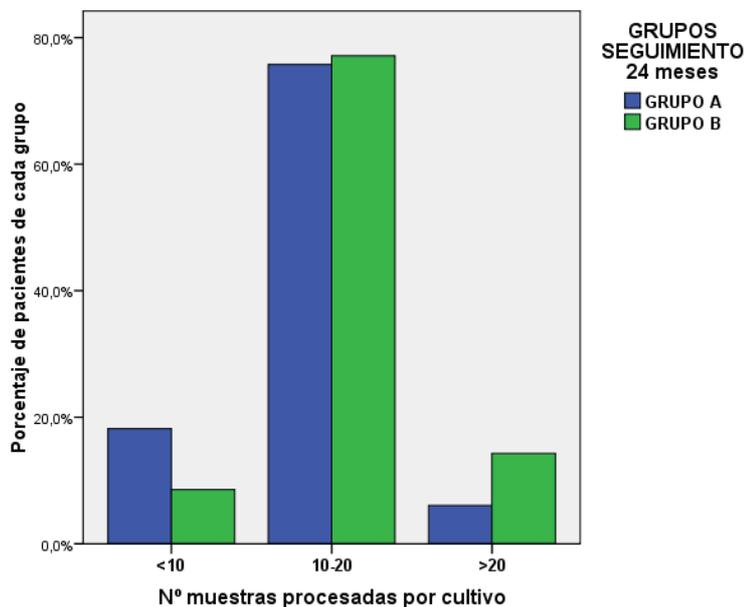


Figura 4.3.2.1. Distribución de los pacientes según el número de muestras totales procesadas por cultivo en el control microbiológico convencional durante los 24 meses de seguimiento analizado. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B, 35 pacientes con algún aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado

En la Figura 4.3.2.2 se muestra la distribución de pacientes de cada grupo según el número de muestras positivas a *P.aeruginosa* en el control microbiológico habitual realizado durante los 24 meses de seguimiento analizado. La prevalencia de aislamiento de *P.aeruginosa* durante el periodo fue del 51,5%.

Un 42,9% de los pacientes del grupo B habían tenido únicamente una muestra positiva en el control microbiológico habitual, el 17,1% 2 muestras positivas y el restante 40,0% 3 o más muestras. Naturalmente, las diferencias entre ambos grupos fueron significativas ($p < 0,001$) puesto que la existencia de cultivos positivos o negativos a *P.aeruginosa* en el control microbiológico habitual durante los 24 meses de seguimiento analizados fue la característica definitoria de cada uno de los dos grupos.

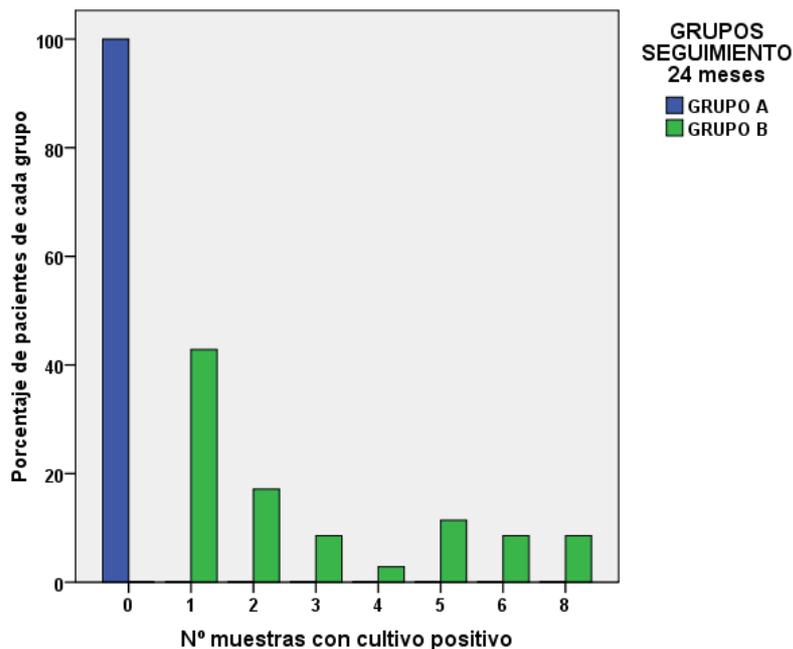


Figura 4.3.2.2. Distribución de los pacientes según el número de muestras con cultivo positivo a *P.aeruginosa* en el control microbiológico habitual durante el periodo de 24 meses de seguimiento analizado. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B, 35 pacientes con algún aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado

En las Tabla 4.3.2.1 se muestra la distribución de pacientes de cada grupo según el tipo de microorganismos diagnosticados en el control microbiológico habitual durante el periodo de 24 meses de seguimiento analizado.

Tabla 4.3.2.1. Tipo y distribución de los microorganismos aislados en el control microbiológico convencional durante los 24 meses de seguimiento analizado.

<i>Microorganismo</i>	<i>Pacientes</i> ¹	<i>GRUPO</i> ²	
		<i>A</i> <i>n=33</i>	<i>B</i> <i>n=35</i>
<i>S.aureus</i>	57(83,8)	28(84,8)	29(82,9)
<i>P.aeruginosa</i>	35(51,5)	0(0,0)	35(100)
<i>Levaduras</i>	27(39,7)	12(36,4)	15(42,9)
<i>Enterobacterias</i>	24(35,3)	10(30,3)	14(40,0)
<i>BGNnoF</i> ³	24(35,3)	11(32,3)	13(37,1)
<i>S.maltophilia</i>	14(20,6)	5(15,2)	9(25,7)
<i>A.xylosoxidans</i>	9(13,2)	6(18,2)	3(8,6)
<i>Hongos filamentosos</i>	19(27,9)	8(24,2)	11(31,4)
<i>H.influenzae</i>	10(14,7)	6(18,2)	4(11,4)
<i>Otros</i>	6(8,8)	3(9,1)	3(8,6)

¹Nº Pacientes con algún aislamiento durante el periodo de seguimiento de 24 meses.

²Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B, 35 pacientes con algún aislamiento de *P.aeruginosa* durante el periodo de seguimiento de 24 meses.

³En dos pacientes del grupo A se aislaron *S.maltophilia* y *A.xylosoxidans*

El microorganismo más frecuente fue *S.aureus* que se aisló en un 83,8% de los pacientes seguido de *P.aeruginosa* que fue positiva en el 51,5% de los pacientes, todos los pertenecientes al grupo B. Los pacientes con cultivo positivo a levaduras y hongos filamentosos representaron un 39,7% y 27,9%, respectivamente. Las enterobacterias y los bacilos Gram negativos no fermentadores se aislaron en igual porcentaje de pacientes (35,3%) y *H.influenzae* en un 14,7% del total de pacientes.

El resto de microorganismos se diagnosticó con mucha menor frecuencia, *S.pneumoniae* y *M.catarrhalis* en solo 3 pacientes (4,4%) y *M.abscessus*, *S.pyogenes* y el virus respiratorio sincitial en únicamente 1 paciente.

Las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los microorganismos excepto naturalmente *P.aeruginosa*.

En la Figura 4.3.2.3 se compara la proporción de cada uno de los microorganismos, distintos de *P.aeruginosa*, diagnosticados en el control microbiológico habitual realizado durante el periodo de seguimiento en los grupos A y B.

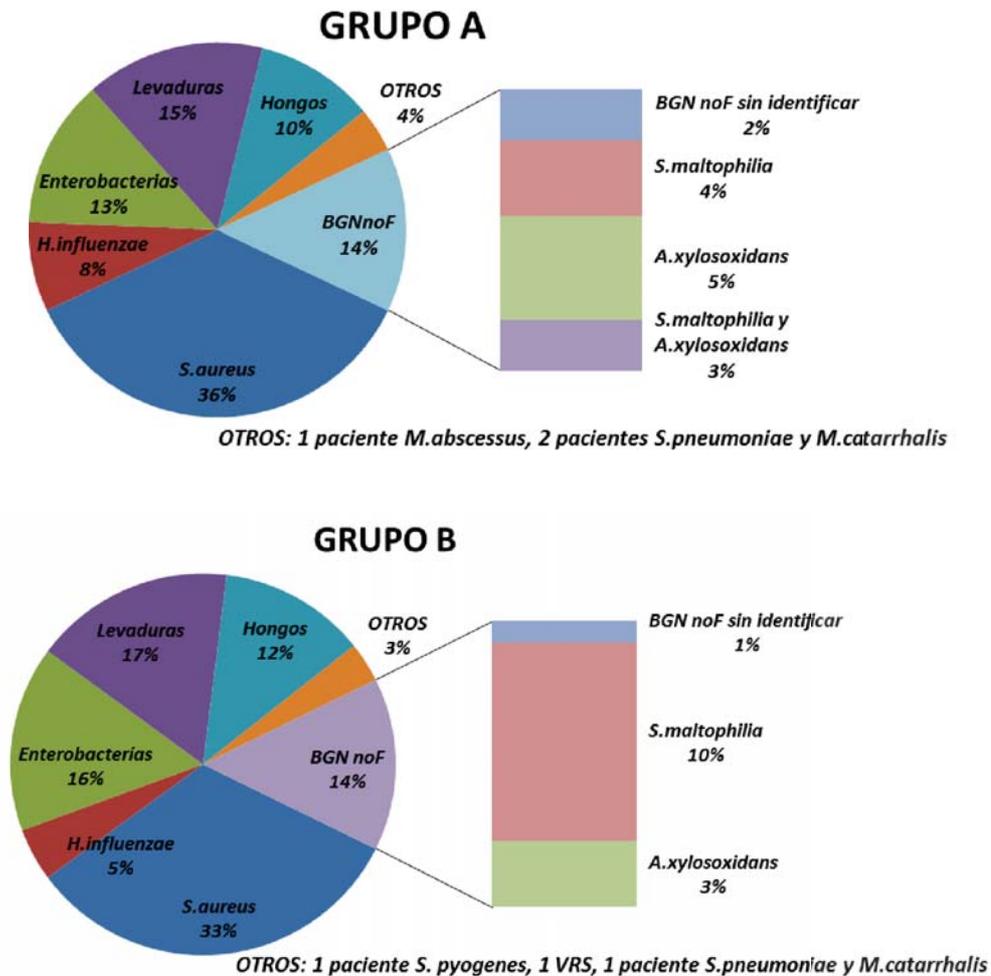


Figura 4.3.2.3. Proporción de microorganismos, distintos de *P.aeruginosa*, diagnosticados en el control microbiológico convencional durante el periodo de 24 meses de seguimiento analizado en cada uno de los grupos. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B, 35 pacientes con algún aislamiento de *P.aeruginosa* durante el periodo de seguimiento de 24 meses

Aunque existe una proporción mayor de aislamientos de *H influenzae* y *A.xylosoxidans* entre los pacientes del grupo A y de levaduras, hongos, enterobacterias y *S.maltophilia* entre los pacientes del grupo B, las diferencias no son estadísticamente significativas.

4.3.3. Resultados obtenidos en el diagnóstico de colonización por *P.aeruginosa*

La distribución de los pacientes en cada uno de los dos grupos según el número de muestras totales de suero y exudado faríngeo que se analizaron para la detección de anticuerpos anti *P.aeruginosa* y del DNA de la bacteria se muestra en la Figura 4.3.3.1

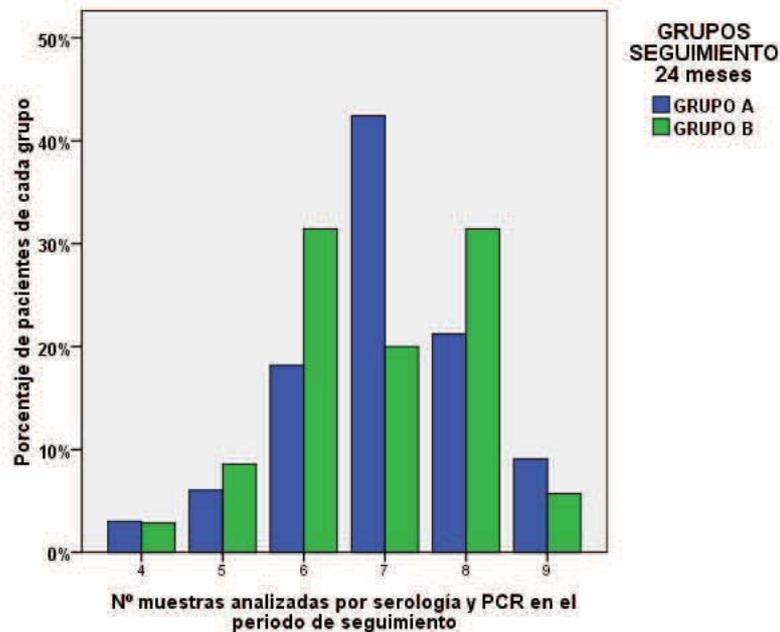


Figura 4.3.3.1 Distribución de los pacientes según el número de muestras totales analizadas por serología y PCR en los 24 meses de seguimiento analizado. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B, 35 pacientes con algún aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado

En 23 pacientes (33,8%) se analizaron entre 8 y 9 muestras de suero y exudado faríngeo durante los 24 meses del seguimiento analizado, sin diferencias estadísticamente significativas entre el grupo A (30,3%) y el grupo B (37,1%). En 38 pacientes (55,9%) se estudiaron entre 6 y 7 muestras sin diferencias significativas entre el grupo A (60,6%) y el grupo B (51,4%). Finalmente, en 7 pacientes (10,3%) se analizaron de 4 a 5 muestras, también sin diferencias significativas entre el grupo A (9,1%) y B (11,5%). En resumen, en el 89,7% de los pacientes se pudieron analizar los resultados obtenidos con un mínimo de 6 muestras de suero y exudado faríngeo durante los 24 meses de seguimiento analizado. La media de muestras analizadas simultáneamente por cultivo, PCR y serología fue de 6,9 durante este periodo.

Para calcular la sensibilidad del cultivo se han tenido en cuenta los resultados obtenidos simultáneamente a las muestras de exudado faríngeo en la que se realizó la técnica de PCR, recogidas simultáneamente con las muestras de suero para la detección de anticuerpos. Los resultados del aislamiento de *P.aeruginosa* en estas muestras se detallan en la Figura 4.3.3.2.

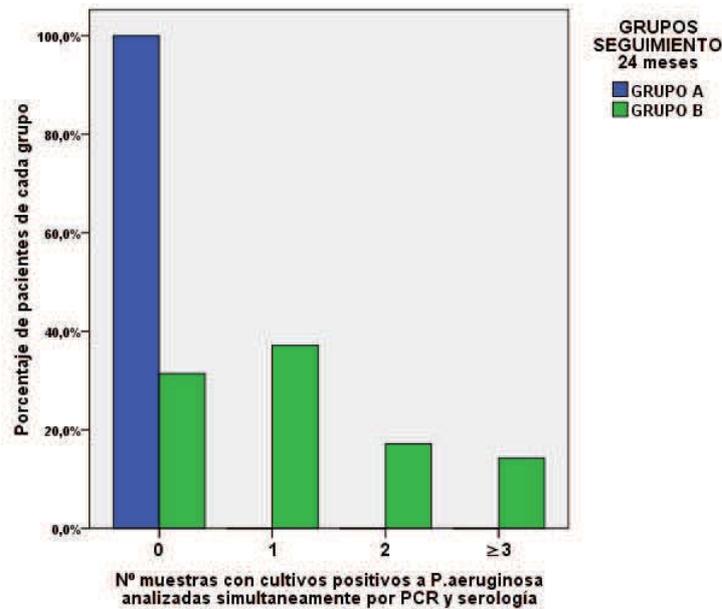


Figura 4.3.3.2. Distribución de los pacientes según el número de cultivos positivos a *P.aeruginosa* en las muestras analizadas simultáneamente por PCR y serología durante los 24 meses de seguimiento analizados. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B, 35 pacientes con algún aislamiento de *P.aeruginosa* durante el periodo de seguimiento.

En el 31,4% de los pacientes del grupo B el cultivo de las muestras simultáneas fue negativo. El 37,2% tuvieron una muestra positiva por cultivo y el 31,4% dos o más. En total, el cultivo fue positivo a *P.aeruginosa* en las muestras analizadas simultáneamente por PCR y serología en 24 de los 35 pacientes del grupo B, lo que representa un 68,6% de sensibilidad para el cultivo simultáneo en los 24 meses de seguimiento analizado.

La relación es estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre los resultados del cultivo durante el periodo de 24 meses de seguimiento analizado y el estatus de colonización en los 12 meses previos al inicio del seguimiento. También lo es ($p < 0,001$) con la colonización en los 12 meses posteriores al final del seguimiento.

En el análisis de los resultados de PCR y detección de anticuerpos se han valorado las técnicas individuales o combinadas con las que se habían obtenido los mejores resultados en el análisis en pacientes estables microbiológicamente. En la Tabla 4.3.3.1 se detallan las técnicas y los puntos de corte utilizados para cada una de ellas.

Tabla 4.3.3.1. Técnicas evaluadas y criterios de positividad utilizados para las técnicas de detección de anticuerpos y del DNA de *P.aeruginosa*

Técnicas para el diagnóstico de la colonización por <i>P.aeruginosa</i>	
Detección DNA	-PCRgyrB ≥ 35 UFC/ml
Detección anticuerpos ^{1,2}	-ELA $\geq 1/240$ ¹ -Punto corte COLONIZADO ²
Pruebas combinadas ^{2,3}	-ELA $\geq 1/240$ y PCRgyrB ≥ 35 UFC/ml -Punto corte COLONIZADO y PCRgyrB ≥ 35 UFC/ml

¹PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo.

²Punto corte COLONIZADO: Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos, utilizando los puntos de corte individuales PA $\geq 1/180$, ELA $\geq 1/240$ y ETA $\geq 1/800$.

³ Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos y la técnica de PCRgyrB de *P.aeruginosa*, utilizando el punto de corte ≥ 35 UFC/muestra.

Para comparar los resultados obtenidos entre el grupo A, sin aislamiento de *P.aeruginosa* y el grupo B, con al menos un cultivo positivo en el seguimiento microbiológico habitual, se han calculado para cada paciente el valor promedio, el valor máximo y el valor mínimo de los resultados cuantitativos obtenidos durante el periodo de seguimiento de 24 meses. En los pacientes en los que el valor máximo era superior al punto de corte pero no lo era el valor promedio se han considerado negativos. Tanto para las técnicas individuales como combinadas, se ha calculado el número de pacientes de cada grupo con valores promedio superiores al punto de corte seleccionado para cada técnica. A partir de este dato, se ha calculado la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y exactitud de cada una de las técnicas individuales o combinadas para identificar el aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado. Los resultados de las técnicas individuales o combinadas se han comparado con los resultados del cultivo convencional simultáneo a las muestras analizadas por PCR y serología.

4.3.3.1 Detección del DNA de *P.aeruginosa* mediante la PCR de la secuencia *gyrB*

En el 84,8% de los pacientes del grupo A, los valores promedio de la PCR $gyrB$ son inferiores a 35 UFC/ml mientras que en 5 (15,2%) pacientes son superiores. Por el contrario, en el grupo B el 91,4% de los pacientes tienen un valor promedio ≥ 35 UFC/ml frente a 3 (8,6%) en los que es inferior. La diferencia entre los grupos A y B es estadísticamente significativa ($p < 0,001$). En la Figura 4.3.3.1.1 se representan gráficamente estos datos, diferenciando dentro del grupo B entre los pacientes que tenían un único aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo durante el periodo de seguimiento (B1), de los pacientes con 2 o más cultivos positivos (B2). No se encontraron diferencias significativas en el número de pacientes con valor promedio de PCR $gyrB \geq 35$ UFC/ml entre los grupos B1 y B2 aunque sí eran significativas entre el grupo A y cada uno de estos 2 grupos por separado ($p < 0,001$).

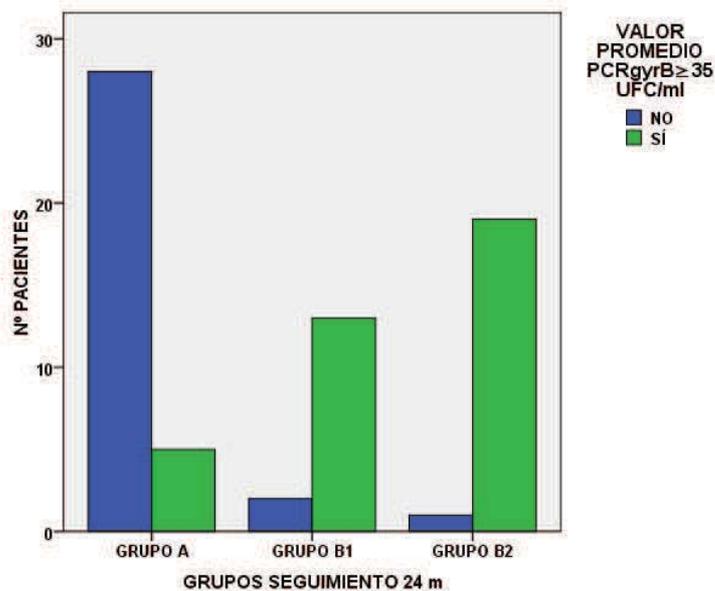


Figura 4.3.3.1.1. Número de pacientes con valor promedio de PCR $gyrB \geq 35$ UFC/ml en los dos grupos estudiados. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes con dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado

La distribución por grupos de la mediana de los valores promedio, máximo y mínimo del número de UFC/ml obtenidos con la PCR de la secuencia *gyrB* aparecen en la Tabla 4.3.3.2. En la Figura 4.3.3.4 se representa gráficamente

Tabla 4.3.3.1.1. Distribución por grupos de la mediana para los valores promedio, máximo y mínimo del número de UFC/ml detectados con PCR *gyrB* en las muestras analizadas durante el periodo de seguimiento de 24 m

GRUPO ¹	Aislamiento <i>P.aeruginosa</i> 24 meses	PCR <i>gyrB</i>			
		Pacientes positivos ²	Valor Promedio ³	Valor Máximo ³	Valor Mínimo ³
Grupo A (n=33)	NO	5(15,2)	4 (0 / 14)	18 (0 / 91)	0
Grupo B (n=35)	SÍ	32(91,4)	250 (48 / 5055)	1064 (196 / 27512)	0
-Grupo B1 (n=15)	1 muestra	13(86,7)	68(30-250)	1827(107-16252)	0
-Grupo B2 (n=20)	≥ 2 muestras	19(95,0)	270(160-1980)	10250(450-75790)	0
TOTAL (n=68)	35 (51,5)	37(54,4)	4 (35,5 / 382,5)	19 (160 / 2565,75)	0

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado. N° positivos (porcentaje respecto al total de cada grupo)

²Numero pacientes con valor promedio ≥35 UFC/ml (porcentaje respecto al total del cada grupo)

³ Mediana del n° UFC/ml. (cuartil 1/ cuartil 3). El valor mínimo es una constante en ambos grupos

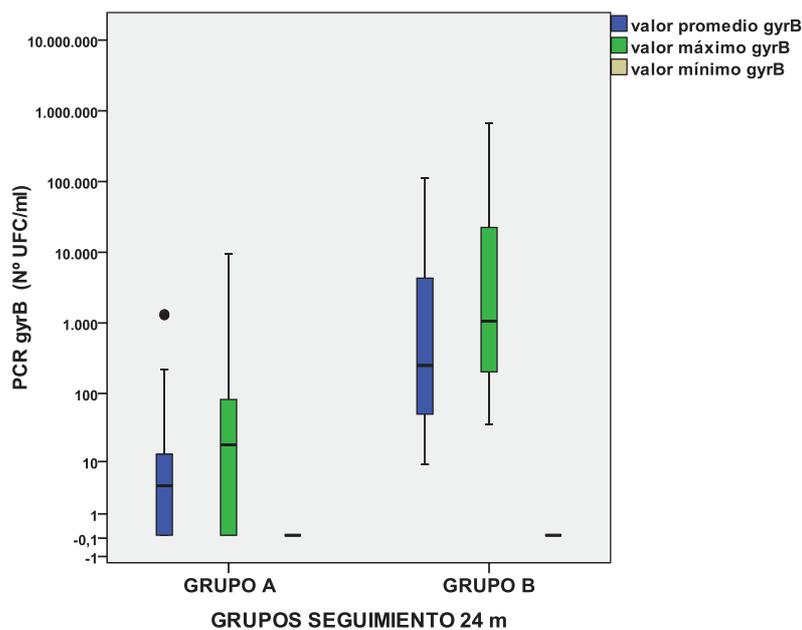


Figura 4.3.3.1.2. Representación gráfica de la mediana de los valores promedio, máximo y mínimo de la PCR*gyrB* durante el periodo de seguimiento de 24 meses. En el gráfico la línea representa el valor de la mediana, el límite superior de la caja corresponde al valor del tercer cuartil (75% de los datos) y el límite inferior al primer cuartil (25%); las dos barras verticales determinan el rango del 95% de los casos. Los valores atípicos están señalados con un punto. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B, 35 pacientes con algún aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 m de seguimiento analizado.

Las diferencias en el valor promedio y máximo fueron significativas entre los grupos A y B1 ($p < 0,001$), A y B2 ($p < 0,001$) y entre B1 y B2 ($p < 0,05$). En el valor mínimo no hay

diferencias puesto que fue una constante, ya que todos los pacientes tuvieron al menos un resultado negativo.

En la Tabla 4.3.3.1.2 se comparan estos resultados con los obtenidos por cultivo convencional. La sensibilidad de la técnica de la PCR $_{gyrB}$ es del 91,4% cuando se consideran positivos los pacientes con un valor promedio de la PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC/ml durante los 24 meses de seguimiento analizado. Para la PCR $_{gyrB}$ la especificidad (84,8%) y el VPP (86,5%) son menores que para el cultivo, ambas del 100%, puesto que es la técnica utilizada como referencia para definir los grupos A y B según el aislamiento o no de *P.aeruginosa*. Los valores de exactitud (88,2%) y VPN (90,3%) son superiores a los del cultivo (83,8% y 80,9%, respectivamente).

Tabla 4.3.3.1.2. Comparación resultados del cultivo con PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC/ml

<i>Aislamiento P.aeruginosa</i> ¹ (24 meses seguimiento analizado)		<i>Cultivo positivo P.aeruginosa</i> ³	<i>PCR$_{gyrB} \geq 35$UFC</i> ⁴
Grupo-A (n=33)	No	0(0,0)	5(15,2)
Grupo-B1 (n=15)	Sí, 1 muestra	7(46,7)	13(86,7)
Grupo-B2 (n=20)	Sí, ≥ 2 muestras	17(85,0)	19(95,0)
TOTAL(n=68)	35 (51,5)	24(35,3)	37(54,4)
S²		68,6 (52,0-81,4)	91,4 (77,6-97,0)
E²		100 (89,6-100)	84,8 (69,1-93,3)
VPP²		100 (86,2-100)	86,5 (72,0-94,1)
VPN²		75,0 (60,6-85,4)	90,3 (75,1-96,7)
Ex²		83,8 (73,3-90,7)	88,2 (78,5-93,9)
p		<0,001	<0,001

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento. Grupo-B2, 20 pacientes con 2 o más aislamientos durante los 24 meses de seguimiento analizado.

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³Numero de pacientes con cultivo convencional positivo en las muestras obtenidas simultáneamente (porcentaje respecto al total del cada grupo)

⁴Numero de pacientes con valor promedio ≥ 35 UFC/ml (porcentaje respecto al total del cada grupo)

La sensibilidad de la técnica de *PCRgyrB* en los pacientes del grupo B1 (86,7%) es mucho mayor que la del cultivo (46,7%), mientras que en el grupo B2 la diferencia no es tan pronunciada (95,0% y 85,0%, respectivamente). De los 37 pacientes con un valor promedio de $PCR\ gyrB \geq 35$ UFC/ml, 24 pacientes tenían también un valor promedio de $PCR\ toxA \geq 20$ UFC/ml, 4 en el grupo A, 5 en el grupo B1 y 15 en el grupo B2.

La relación entre los resultados del *PCRgyrB* durante el periodo de 24 meses de seguimiento analizado y el estatus de colonización en los 12 meses previos al inicio del seguimiento es estadísticamente significativa ($p < 0,05$). También lo es ($p < 0,001$) la asociación con la colonización en los 12 meses posteriores al final del seguimiento.

4.3.3.2 Detección de anticuerpos frente al antígeno elastasa

En el 93,9% de los pacientes del grupo A, el valor promedio de los resultados de la detección de anticuerpos anti-elastasa (ELA) es inferior al título 1/240 y solo en 2 pacientes (6,1%) el valor promedio es superior. Por el contrario, en el grupo B el 51,4% de los pacientes tienen un valor promedio $\geq 1/240$ mientras que en el 48,6% es inferior.

Las diferencias entre el grupo A y B en el número de pacientes con valor promedio de anticuerpos anti-ELA $\geq 1/240$ son estadísticamente significativas ($p < 0,001$). En la Figura 4.3.3.2.1 se representan gráficamente estos resultados. Las diferencias fueron estadísticamente significativas también entre el grupo A y los grupos B1 ($p < 0,01$) y B2 ($p < 0,001$) pero no entre los grupos B1 y B2.

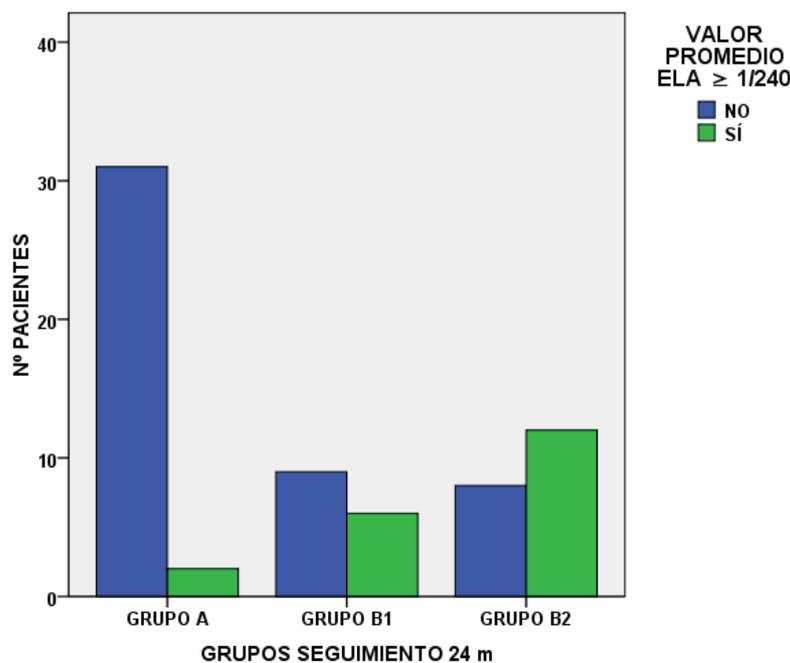


Figura 4.3.3.2.1. Número de pacientes con valor promedio del título anticuerpos anti-ELA $\geq 1/240$ en los dos grupos estudiados. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado

La distribución por grupos de los valores promedio, máximo y mínimo del título de anticuerpos anti-ELA aparecen en la Tabla 4.3.3.2.1

Tabla 4.3.3.2.1. Distribución por grupos de la mediana para los valores promedio, máximo y mínimo del título de anticuerpos anti-elastasa (ELA) de los resultados obtenidos en las muestras analizadas durante el periodo de seguimiento de 24 m

GRUPO¹	Aislamiento <i>P.aeruginosa</i> 24 meses	Título anticuerpos anti ELA			
		Pacientes positivos²	Valor Promedio³	Valor Máximo³	Valor Mínimo³
Grupo A (n = 33)	NO	2(6,1)	29 (7,5 / 105,5)	60 (47,5 / 200)	0 (0 / 35)
Grupo B (n=35)	SÍ	18(51,4)	215 (21 / 440)	520 (65 / 890)	15 (0 / 95)
-Grupo B1 (n=15)	1 muestra	6(40,0)	28 (9-346)	150 (45-860)	0 (0 / 0)
-Grupo B2 (n=20)	≥ 2 muestras	12(60,0)	242 (57-744)	580 (100-1291)	50 (4 / 159)
TOTAL (n= 68)	35 (51,5)	21(30,9)	57,5 (10 / 256,5)	120 (50 / 546,5)	0 (0 / 60)

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes 2 o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado. N° positivos (porcentaje respecto al total de cada grupo)

²Numero pacientes con valor promedio del título de anticuerpos anti ELA $\geq 1/240$ (porcentaje respecto al total del cada grupo)

³Mediana del valor inverso del título (cuartil 1/ cuartil 3).

Las diferencias entre los grupos A y B fueron significativas para los valores promedio ($p < 0,01$) y máximo ($p < 0,01$). Sin embargo cuando se comparan dos a dos, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los grupos A y B1 ni entre B1 y B2 para ninguno de los valores, excepto para el valor mínimo entre B1 y B2. Por el contrario, entre los grupos A y B2 las diferencias sí son significativas para los valores promedio ($p < 0,01$), máximo ($p < 0,01$) y mínimo ($p < 0,05$).

En la Tabla 4.3.3.2.2 se comparan estos resultados con los obtenidos por cultivo convencional.

Cuando se consideran positivos los pacientes con un valor promedio del título de anticuerpos anti ELA superior al título $1/240$, la sensibilidad de la detección de anticuerpos es inferior (51,4%) a la del cultivo (68,6%), Lo mismo ocurre con el VPN y la exactitud, también inferiores al cultivo. Por el contrario, especificidad y VPP son buenos con valores por encima del 90%.

Tabla 4.3.3.2.2. Comparación de los resultados del cultivo con los de la detección de anticuerpos anti-ELA \geq 1/240

<i>Aislamiento P.aeruginosa</i> ¹ (24 meses seguimiento)		<i>Cultivo positivo P.aeruginosa</i> ³	ELA \geq 1/240 ⁴
Grupo-A (n=33)	No	0(0,0)	2(6,1)
Grupo-B1 (n=15)	Sí, 1 muestra	7(46,7)	6(40,0)
Grupo-B2 (n=20)	Sí, \geq 2 muestras	17(85,0)	12(60,0)
TOTAL(n=68)	35 (51,5)	24(35,3)	20(29,4)
<i>S</i> ²		68,6 (52,0-81,4)	51,4 (35,6-67,0)
<i>E</i> ²		100 (89,6-100)	93,9 (80,4-98,3)
<i>VPP</i> ²		100 (86,2-100)	90,0 (69,9-97,2)
<i>VPN</i> ²		75,0 (60,6-85,4)	64,6 (50,4-76,6)
<i>Ex</i> ²		83,8 (73,3-90,7)	72,1 (60,4-81,3)
<i>p</i>		<0,001	<0,001

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes 2 o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante el periodo de seguimiento de 24 meses. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³Numero pacientes con cultivo convencional positivo en las muestras obtenidas simultáneamente.

⁴Numero pacientes con valor promedio del título anti-ELA \geq 1/240 (porcentaje respecto al total del cada grupo)

La correlación entre los resultados de la detección de anticuerpos anti ELA durante el periodo de 24 meses de seguimiento analizado y el estatus de colonización en los 12 meses previos al inicio del seguimiento no es estadísticamente significativa. Tampoco alcanza significación estadística la asociación con el estatus de colonización en los 12 meses posteriores al final del seguimiento.

4.3.3.3. Resultados combinados de la detección del DNA mediante PCR de la secuencia *gyrB* y de anticuerpos frente al antígeno elastasa

Se han valorado conjuntamente los resultados de las técnicas de detección de anticuerpos anti-elastasa (ELA), utilizando como punto de corte el título $\geq 1/240$ y la PCR $_{gyrB}$ de *P.aeruginosa*, utilizando como punto de corte ≥ 35 UFC/ml. Se ha considerado positivos los pacientes con el valor promedio de al menos una de las dos técnicas positivas por encima del punto de corte.

En el grupo B, 34 (97,1%) de los 35 pacientes tienen un valor promedio de al menos una de las dos pruebas por encima del punto de corte establecido. Por el contrario, en el 78,8% de los pacientes del grupo A el valor promedio de ambas pruebas es inferior y ningún paciente tenía ambas pruebas positivas simultáneamente. Las diferencias entre el grupo A y B son estadísticamente significativas ($p < 0,001$). En la Figura 4.3.3.3.1 se representan gráficamente estos resultados, diferenciando entre los pacientes del grupo B con un único aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo durante el periodo de 24 meses de seguimiento analizado (B1) de los pacientes con dos o más cultivos positivos (B2).

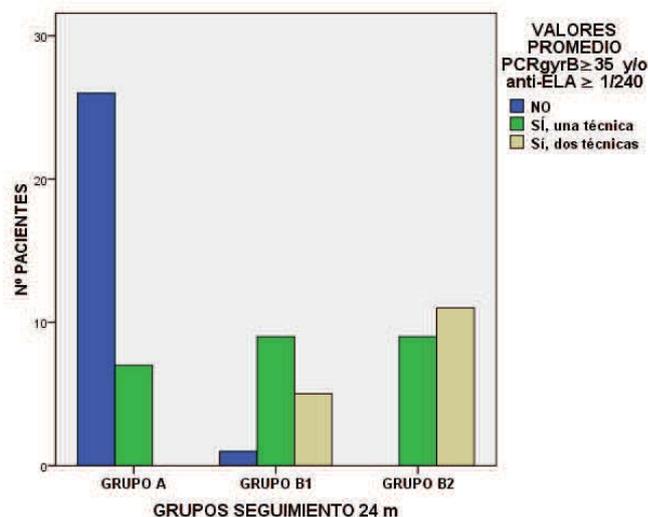


Figura 4.3.3.3.1. Número de pacientes con valores promedio de PCR $_{gyrB}$ ≥ 35 UFC/ml y/o del título de anticuerpos anti-ELA $\geq 1/240$ en los dos grupos estudiados. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes 2 o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado.

Las diferencias fueron significativas entre los grupos A y B1 ($p < 0,001$) y entre A y B2 ($p < 0,001$), Dentro del grupo B las diferencias no son significativas entre B1 y B2. En la Tabla 4.3.3.3.1 se comparan estos resultados con los obtenidos por cultivo convencional.

Tabla 4.3.3.3.1. Comparación de los resultados del cultivo con los resultados combinados de la *PCRgyrB* ≥ 35 UFC/ml y de la detección de anticuerpos anti-ELA $\geq 1/240$

<i>Aislamiento P.aeruginosa</i> ¹ (24 meses seguimiento)		<i>Cultivo positivo P.aeruginosa</i> ³	<i>PCRgyrB</i> ≥ 35 UFC/ml y/o anti-ELA $\geq 1/240$ ⁴
Grupo-A (n=33)	No	0(0,0)	7(21,2)
Grupo-B1 (n=15)	Sí, 1 muestra	7(46,7)	14(93,3)
Grupo-B2 (n=20)	Sí, ≥ 2 muestras	17(85,0)	20(100)
TOTAL(n=68)	35 (51,5)	24(35,3)	41(60,3)
<i>S</i> ²		68,6 (52,0-81,4)	97,1 (85,5-99,5)
<i>E</i> ²		100 (89,6-100)	78,8 (62,2-89,3)
<i>VPP</i> ²		100 (86,2-100)	82,9 (68,7-91,5)
<i>VPN</i> ²		75,0 (60,6-85,4)	96,3 (81,7-99,3)
<i>Ex</i> ²		83,8 (73,3-90,7)	88,2 (60,4-81,3)
<i>p</i>		<0,001	<0,001

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento, Grupo-B2, 20 pacientes con dos o más aislamientos durante los 24 meses de seguimiento analizado. N° positivos (porcentaje respecto al total de cada grupo)

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³Numero pacientes con cultivo convencional positivo en las muestras obtenidas simultáneamente.

⁴Numero pacientes con valores promedio de *PCRgyrB* ≥ 35 UFC/ml y/o del título anti-ELA $\geq 1/240$ (porcentaje respecto al total del cada grupo)

Cuando se combinan los resultados de la detección de anticuerpos anti-ELA y la *PCRgyrB* y se comparan con el cultivo, mejoran sensibilidad (97,1% vs 68,6%), VPN (96,3% vs 75,0%) y exactitud (88,2% vs 83,8%). Como ocurría con las técnicas de individuales, la especificidad y el VPP son peores que para el cultivo (100%), ya que ésta es la técnica utilizada como referencia para definir los grupos. Combinando ambas técnicas, se obtienen mejores sensibilidad (97,1%) y VPP (96,3%) con la misma exactitud (88,2%) que con la técnica de PCR sola (91,4%, 90,3% y 88,2%, respectivamente). Sin embargo, la especificidad (78,8%) y el VPP (82,9%) son peores respecto a la *PCRgyrB* sola (84,8% y 86,5%, respectivamente).

4.3.3.4. Resultados combinados de las tres técnicas de detección de anticuerpos frente a los antígenos fosfatasa alcalina, elastasa y exotoxina A

Para valorar los resultados combinados de las tres técnicas de detección de anticuerpos se han calculado también los valores promedio del título de anticuerpos anti-fosfatasa alcalina (PA) y anti-exotoxina A (ETA) de la misma forma que se hizo para el título de anticuerpos anti-elastasa (ELA). En la Figura 4.3.3.4.1 se representan gráficamente la distribución por grupos de estos resultados.

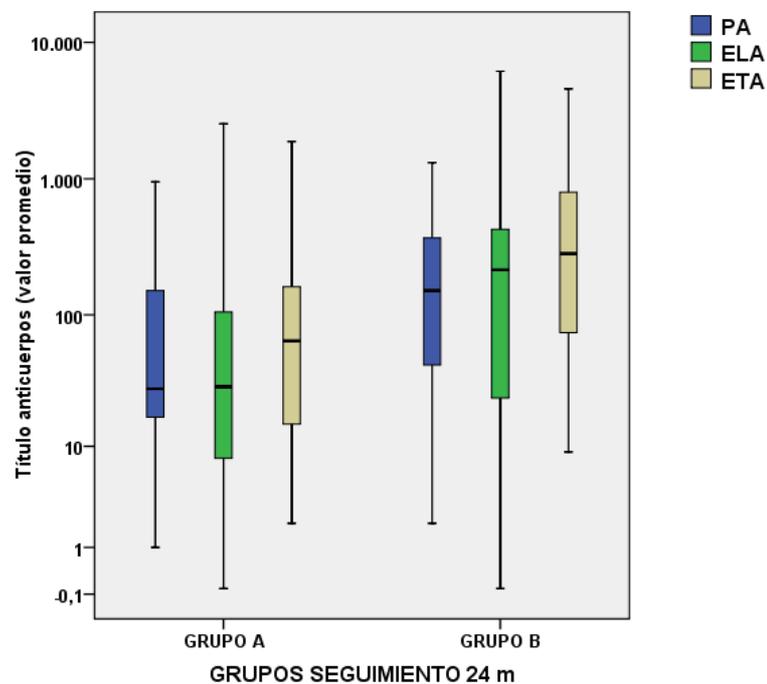


Figura 4.3.3.4.1 Representación gráfica de la mediana de los valores promedio del título de anticuerpos anti-PA, anti ELA y anti-ETA durante los 24 meses de seguimiento analizados. En el gráfico la línea representa el valor de la mediana, el límite superior de la caja corresponde al valor del tercer cuartil (75% de los datos) y el límite inferior al primer cuartil (25%); las dos barras verticales determinan el rango del 95% de los casos. Se ha utilizado el valor inverso del título. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B, 35 pacientes con algún aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado.

En el 75,8% de los pacientes del grupo A, el valor promedio del título de anticuerpos anti-PA es inferior a 1/180 y en 8 pacientes (24,2%) es superior. En el grupo B, el 51,4 % de

los pacientes tienen un valor promedio $\geq 1/180$ mientras que en 17 es inferior (48,6%). Las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En el 93,9 % de los pacientes del grupo A, el valor promedio del título de anticuerpos anti-ELA es inferior a $1/240$ y solo en 2 pacientes (6,1%) es superior. En el grupo B, el 51,4% de los pacientes tienen un valor promedio $\geq 1/240$ mientras que en 17 es inferior (48,6%). Las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

En el 93,9 % de los pacientes del grupo A, el valor promedio del título de anticuerpos anti-ETA es inferior a $1/800$. En el grupo B, el 37,1% de los pacientes tienen un valor promedio $\geq 1/800$. Las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

En el Figura 4.3.3.4.2 se representan gráficamente estos datos. Se ha diferenciado entre los pacientes del grupo B con un único aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo durante los 2 años de seguimiento (B1) de los pacientes con 2 o más cultivos positivos (B2).

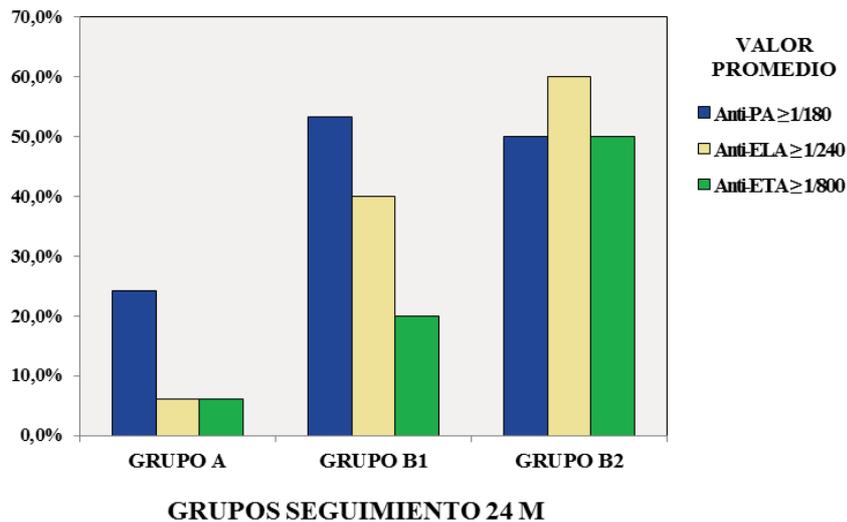


Figura 4.3.3.4.2. Número de pacientes con valor promedio del título de anticuerpos anti-PA $\geq 1/180$, anti-ELA $\geq 1/240$ y anti-ETA $\geq 1/800$ en los 24 meses de seguimiento analizado. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado.

No existe correlación entre los resultados del valor promedio de anticuerpos durante el periodo de seguimiento de 24 meses y el estatus de colonización en los 12 meses previos al inicio del seguimiento para ninguno de los tres antígenos. La asociación con la colonización

en los 12 meses posteriores al final del seguimiento únicamente alcanza significación estadística para el antígeno ETA ($p < 0,05$).

Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos utilizando los puntos de corte individuales $PA \geq 1/180$, $ELA \geq 1/240$ y $ETA \geq 1/800$. En el 75,8% de los pacientes del grupo A el promedio de anticuerpos es negativo para los tres antígenos, 5 (15,2%) tenían anticuerpos frente a un antígenos y 3 (9,1%) frente a dos o tres antígenos. En el grupo B, 27 pacientes (77,1 %) tienen un valor promedio de anticuerpos superior al punto de corte al menos frente a uno de los tres antígenos, 13 (37,1%) frente a un antígeno y 14 pacientes (40,0%) frente a dos o tres antígenos. La diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas ($p < 0,001$). En el Figura 4.3.3.4.3 se representan gráficamente estos datos.

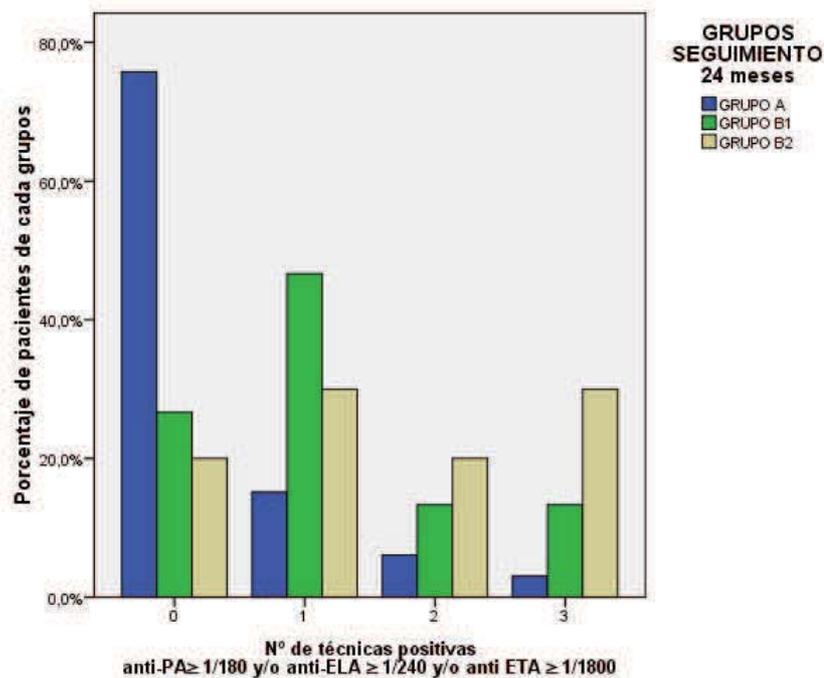


Figura 4.3.3.4.3. Porcentaje de pacientes de cada grupo con valores promedio del título de anticuerpos anti-PA $\geq 1/180$ y/o anti-ELA $\geq 1/240$ y/o anti ETA $\geq 1/800$ según el número de técnicas positivas. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes con 2 o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado.

Entre el grupo A y el grupo B1 las diferencias alcanzan significación estadística ($p < 0,01$) en el número de pacientes con valores promedio del título de anticuerpos superiores

a los puntos de corte en al menos uno de los tres antígenos. También son significativas las diferencias cuando se comparan los grupos A y B2 ($p < 0,001$). Cuando se comparan los grupos B1 y B2, las diferencias en el número de pacientes con al menos una de las tres técnicas positivas no son estadísticamente significativas. Cuando se consideran positivos los pacientes con anticuerpos frente a un mínimo de 2 antígenos las diferencias solo son significativas entre el grupo A y el B2 ($p < 0,01$).

Para valorar la capacidad de las tres técnicas de detección de anticuerpos combinadas para identificar colonización por *P.aeruginosa*, estos resultados se han comparado con los resultados del cultivo convencional que se había realizado simultáneamente a la obtención de las muestras para detección de anticuerpos.

Se han utilizado dos criterios de positividad:

1. Se han considerado positivos los pacientes con el valor promedio del título de anticuerpos igual o superior al punto de corte ($PA \geq 1/180$ y/o $ELA \geq 1/240$ y/o $ETA \geq 1/800$) frente al menos uno de los antígenos. Se ha denominado ***Punto de corte COLONIZADO Pos ≥ 1***
2. Se han considerado positivas los pacientes con el valor promedio del título de anticuerpos igual o superior al punto de corte ($PA \geq 1/180$ y/o $ELA \geq 1/240$ y/o $ETA \geq 1/800$) frente al menos dos de los antígenos Se ha denominado ***Punto de corte COLONIZADO Pos ≥ 2***

En la Tabla 4.3.3.7 se comparan los resultados combinados de las tres técnicas de detección de anticuerpos con los resultados del cultivo.

Cuando se utiliza el criterio del punto de corte COLONIZADO Pos ≥ 1 , y los resultados combinados de las tres técnicas de detección de anticuerpos se comparan con el cultivo mejora la sensibilidad (77,1% vs 68,6%), pero ni el VPN (75,8% vs 75,0%) ni la exactitud (76,5% vs 83,8%). Como ya se ha comentado, la especificidad y el VPP son peores que para el cultivo (100%), ya que ésta es la técnica utilizada como referencia para definir los grupos A y B según el aislamiento o no de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado.

Utilizando el criterio del Punto corte COLONIZADO Pos ≥ 2 los resultados son peores. Solo el 40,0% de los pacientes del grupo B son positivos. Por el contrario, 30 (90,9%) de los 33 pacientes del grupo A son negativos.

Tabla 4.3.3.7. Comparación de los resultados del cultivo con los resultados combinados de las tres técnicas de detección de anticuerpos

<i>Aislamiento P.aeruginosa</i> ¹ (24 meses seguimiento)		<i>Cultivo positivo P.aeruginosa</i> ³	<i>Punto corte COLONIZADO</i> ⁴	
			<i>Pos ≥ 1</i>	<i>Pos ≥ 2</i>
Grupo-A (n=33)	No	0(0,0)	8(24,2)	3(9,1)
Grupo-B1 (n=15)	Sí, 1 muestra	7(46,7)	11(73,3)	4(26,7)
Grupo-B2 (n=20)	Sí, ≥ 2 muestras	17(85,0)	16(80,0)	10(50,0)
TOTAL(n=68)	35 (51,5)	24(35,3)	35(51,5)	17(25,0)
<i>S</i> ²		68,6 (52,0-81,4)	77,1 (61,0-87,9)	40,0 (25,6-56,4)
<i>E</i> ²		100 (89,6-100)	75,8 (59,0-87,2)	90,9 (76,4-96,9)
<i>VPP</i> ²		100 (86,2-100)	77,1 (61,0-87,9)	82,4 (59,0-93,8)
<i>VPN</i> ²		75,0 (60,6-85,4)	75,8 (59,0-87,2)	58,8 (45,2-71,2)
<i>Ex</i> ²		83,8 (73,3-90,7)	76,5 (60,4-81,3)	64,7 (52,8-75,0)
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,01

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes con dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado. N° positivos (porcentaje respecto al total de cada grupo)

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³Numero pacientes con cultivo convencional positivo en las muestras obtenidas simultáneamente.

⁴Numero pacientes con valores promedio del título de anticuerpos anti- PA $\geq 1/180$ y/o ELA $\geq 1/240$ y/o ETA $\geq 1/800$ (porcentaje respecto al total del cada grupo) según el número de antígenos frente a los que se detectan anticuerpos

Si se combinan las tres técnicas de detección de anticuerpos, se obtiene mejor sensibilidad (77,1%), VPN (75,8%) y exactitud (76,5%) que con la técnica de detección de anticuerpos anti-ELA sola (51,4%, 64,6% y 72,1%, respectivamente). Sin embargo, la especificidad (75,8% vs 93,9%) y el VPP (77,1% vs 90,0%) son peores con los resultados combinados de las tres técnicas de detección de anticuerpos.

4.3.3.5. Resultados combinados de la detección del DNA mediante PCR de la secuencia *gyrB* y de la detección de anticuerpos frente a los antígenos fosfatasa alcalina, elastasa y exotoxina A

Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos utilizando los puntos de corte individuales anticuerpos anti-fosfatasa alcalina (PA) $\geq 1/180$, anti-elastasa (ELA) $\geq 1/240$ y anti- exotoxina A (ETA) $\geq 1/800$ junto con los resultados de la PCR $gyrB \geq 35$ UFC/ml. Se han utilizado tres criterios de positividad:

1. Se han considerado positivos los pacientes con el valor promedio del título de anticuerpos igual o superior al punto de corte (PA $\geq 1/180$ y/o ELA $\geq 1/240$ y/o ETA $\geq 1/800$ y/o la PCR $gyrB \geq 35$ UFC/ml) frente al menos una de las técnicas. Se ha denominado **Punto de corte COLONIZADO y PCR $gyrB$ Pos ≥ 1** .
2. Se han considerado positivos los pacientes con al menos 2 de las técnicas positivas. Se ha denominado **Punto de corte COLONIZADO y PCR $gyrB$ Pos ≥ 2** .
3. Se han considerado positivos los pacientes con al menos tres de las técnicas positivas. Se ha denominado **Punto de corte COLONIZADO y PCR $gyrB$ Pos ≥ 3** .

En el 63,6% de los pacientes del grupo A, el valor promedio de los resultados de las cuatro técnicas es negativo, 8 (24,2%) tenían resultados positivos frente a una sola técnica y solo 4 (12,1%) frente a 2 o más técnicas.

En el grupo B el 97,1 % de los pacientes tienen un valor promedio superior al punto de corte en al menos una de las cuatro técnicas. 8 (22,9%) para una técnica y 26 pacientes (74,3%) en dos o más técnicas. La diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas ($p < 0,001$), utilizando cualquiera de los tres criterios de positividad.

En el Figura 4.3.3.5.1 se representan gráficamente el número de técnicas positivas en cada uno de los grupos. Se ha diferenciado también entre los pacientes del grupo B con un único aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo durante los 2 años de seguimiento (B1) de los pacientes con 2 o más cultivos positivos (B2).

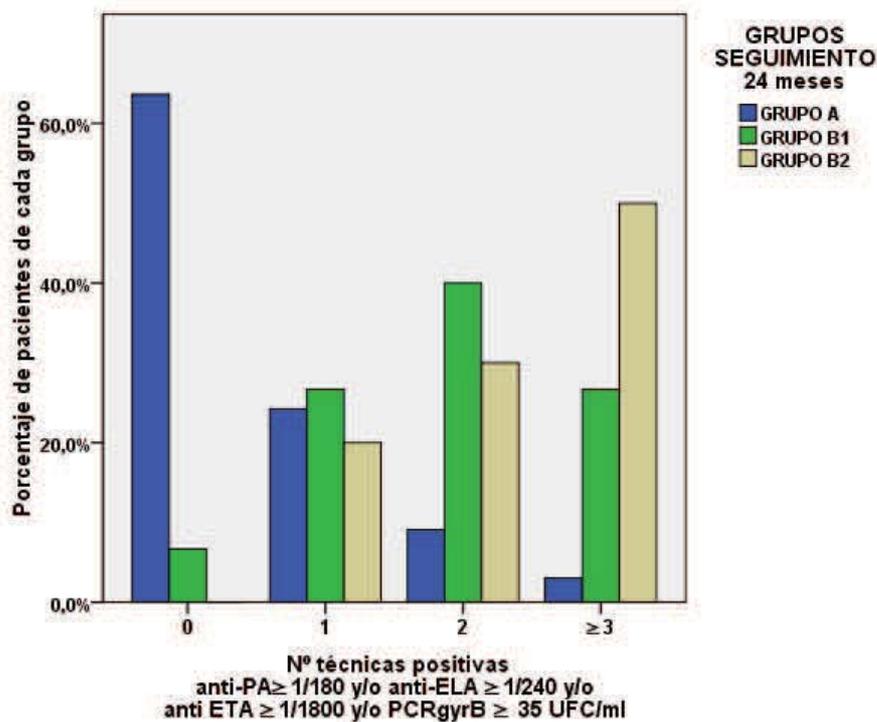


Figura 4.3.3.5.1. Porcentaje de pacientes de cada grupo con valores promedio del título de anticuerpos anti-PA \geq 1/180 y/o anti-ELA \geq 1/240 y/o anti ETA \geq 1/1800 y/o PCRgyrB \geq 35 UFC/ml según el número de técnicas positivas. Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento. Grupo-B2, 20 pacientes 2 o más aislamientos durante el periodo de seguimiento de 24 meses.

Entre el grupo A y el grupo B1 las diferencias en el número de pacientes con valores promedio superiores a los puntos de corte alcanzan significación estadística cuando se consideran positivas un mínimo de una ($p<0,001$), dos ($p<0,001$) o tres ($p<0,05$) de las cuatro técnicas. También son significativas las diferencias ($p<0,001$) entre los grupos A y B2 pero no entre los grupos B1 y B2.

En la Tabla 4.3.3.5.1 se comparan los resultados combinados de las tres técnicas de detección de anticuerpos y la PCRgyrB con los resultados del cultivo

Tabla 4.3.3.5.1. Comparación de los resultados del cultivo con los resultados combinados de las tres técnicas de detección de anticuerpos y la PCRgyrB

<i>Aislamiento P.aeruginosa</i> ¹ (24 meses seguimiento)		<i>Cultivo positivo P.aeruginosa</i> ³	<i>Punto corte COLONIZADO y/o PCR gyrB ≥ 35 UFC/ml</i> ⁴		
			<i>Pos ≥ 1</i>	<i>Pos ≥ 2</i>	<i>Pos ≥ 3</i>
Grupo-A (n=33)	No	0(0,0)	12(36,4)	4(12,1)	1(3,0)
Grupo-B1 (n=15)	Sí, 1 muestra	7(46,7)	14(93,3)	10(66,7)	4(26,7)
Grupo-B2 (n=20)	Sí, ≥ 2 muestras	17(85,0)	20(100,0)	16(80,0)	10(50,0)
TOTAL(n=68)	35 (51,5)	24(35,3)	46(67,6)	30(44,1)	15(22,1)
<i>S</i> ²		68,6 (52,0-81,4)	97,1 (85,5-99,5)	74,3 (57,9-85,8)	40,0 (25,6-56,4)
<i>E</i> ²		100 (89,6-100)	63,6 (46,6-77,8)	87,9 (72,7-95,2)	97,0 (84,7-99,5)
<i>VPP</i> ²		100 (86,2-100)	73,9 (59,7-84,4)	86,7 (70,3-94,7)	93,3 (70,2-98,8)
<i>VPN</i> ²		75,0 (60,6-85,4)	95,5 (78,2-99,2)	76,3 (60,8-87,0)	60,4 (46,9-72,4)
<i>Ex</i>		83,8 (73,3-90,7)	80,9 (70,0-88,5)	80,9 (70,0-88,5)	67,6 (55,8-77,6)
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes con dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante el periodo de seguimiento de 24 meses. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³Numero pacientes con cultivo convencional positivo en las muestras obtenidas simultáneamente.

⁴Numero pacientes con valores promedio del título de anticuerpos anti- PA ≥ 1/180 y/o ELA ≥ 1/240 y/o ETA ≥ 1/800 y/o la PCRgyrB ≥ 35 UFC/ml (porcentaje respecto al total del cada grupo) según el número de técnicas positivas.

Cuando se utiliza el punto de corte COLONIZADO y PCRgyrB Pos ≥ 1 y los resultados se comparan con el cultivo, mejoran sensibilidad (97,1% vs 68,6%) y VPN (95,5% vs 75,0%) pero no la exactitud (80,9% vs 83,8%). Como ocurre en todas las comparaciones con el cultivo, la especificidad (63,8%) y el VPP (73,9%) son peores.

Cuando se utiliza el punto de corte COLONIZADO y PCRgyrB Pos ≥ 2, los resultados de especificidad (87,9%) y el VPP (86,7%) mejoran conservando la misma exactitud (80,9%) pero a costa de un descenso de la sensibilidad (74,3%) y del VPN (76,3%) que continúan siendo mejores que el cultivo aislado.

4.3.4. Tiempo transcurrido hasta primer resultado positivo para la detección de DNA y anticuerpos anti *P.aeruginosa*. Comparación con los resultados del cultivo

Para valorar la capacidad de las diferentes técnicas, individualmente o combinadas entre sí, para detectar la colonización por *P.aeruginosa* más precozmente que el aislamiento por cultivo se ha recogido para cada técnica el tiempo transcurrido hasta el primer resultado positivo. Estos resultados se han comparado con los obtenidos con el control microbiológico habitual, utilizado para definir cada uno de los grupos estudiados según se hubiera (grupo B) o no (grupo A) aislado *P.aeruginosa* durante el periodo de seguimiento de 24 meses. En la Tabla-4.3.4.1 se presentan el número de pacientes positivos para cada técnica y la media de meses hasta el primer resultado positivo.

Tabla 4.3.4.1. Media del tiempo transcurrido hasta primer resultado positivo para cada técnica individual

Aislamiento <i>P.aeruginosa</i> ¹ (24 meses seguimiento)		Nº pacientes positivos/Tiempo hasta primer resultado positivo ²			
		Control microbiológico habitual	Cultivo simultaneo	PCR <i>gyrB</i> ≥ 35 UFC/ml	ELA ≥ 1/240
GRUPO A (n=33)	No	0	0	5	2
GRUPO B (n=35)	SÍ	35 9,4 (0-22/7,6)	24 9,3 (0-24/8,4)	32 4,9 (0 -18 /5,2)	18 6,0(0-18 / 6,7)
Grupo B1(n=15)	1 muestra	15 13,9 (3-19 /6,6)	7 13,3 (3-21 /6,9)	13 6,5 (0 -12 /4,7)	6 6,5 (0 -18 /8,1)
Grupo B2(n=20)	≥ 2 muestras	20 6,1 (0 -20 /6,7)	17 7,6 (0-24 / 8,6)	19 3,8 (0-18 / 5,4)	12 5,8 (0 -18 /6,3)

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes con dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizados.

²Nº pacientes con resultados positivos. En meses, promedio (rango/desviación estándar)

Se han valorado únicamente los resultados de los pacientes con aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo durante los 24 meses de seguimiento analizado (grupo B). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del control microbiológico habitual, con una media de tiempo hasta el primer resultado positivo de 9,4 meses, y los de la PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC/ml ($p < 0,001$) con una media de 4,9 meses. Las diferencias con los resultados de la detección de anticuerpos anti-ELA $\geq 1/240$, que fue de 6,0 meses, también fueron significativas ($p < 0,05$). No fueron significativas para ninguna de las otras técnicas de forma individual.

En la Tabla-4.3.4.2 se detallan el número de pacientes positivos y la media de meses hasta el primer resultado positivo cuando se combinan los resultados de la técnica de PCR *gyrB* ≥ 35 UFC/ml y las técnicas de detección de anticuerpos. Las diferencias en el tiempo hasta el primer resultado positivo con los resultados del control microbiológico habitual (9,4 meses) son estadísticamente significativas para la combinación de PCR $_{gyrB}$ y anticuerpos anti-ELA ($p < 0,001$).

Tabla 4.3.4.2. Media del tiempo transcurrido hasta primer resultado positivo cuando se combina el cultivo y las técnicas de detección de anticuerpos o del DNA.

Aislamiento <i>P.aeruginosa</i> ¹ (24 meses seguimiento)		Nº pacientes positivos/Tiempo hasta primer resultado positivo ²				
		Control microbiológico habitual	Cultivo simultaneo	PCR <i>gyrB</i> ≥ 35 UFC/ml		
				y/o ELA $\geq 1/240$	y/o pto corte COLONIZADO ³	
				≥ 1	≥ 2	
GRUPO A (n=33)	No	0	0	7	12	4
GRUPO B (n=35)	SÍ	35 9,4 (0-22/7,6)	24 9,3 (0-24/8,4)	34 4,8 (0-18/5,1)	34 3,8(0-18/5,1)	26 5,7 (0-21/7,1)
Grupo B1(n=15)	1 muestra	15 13,9 (3-19 /6,6)	7 13,3 (3-21 /6,9)	14 6,0 (0-12/4,8)	14 6,0 (0-12/4,8)	10 9,6 (0-21/8,0)
Grupo B2(n=20)	≥ 2 muestras	20 6,1 (0 -20 /6,7)	17 7,6 (0-24 / 8,6)	20 3,9 (0-18/5,2)	20 2,3(0-18/4,8)	16 3,2(0-18/5,3)

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*; Grupo-B2, 20 pacientes con dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizados.

²Nº pacientes con resultados positivos. En meses, promedio (rango/desviación estándar)

³Anticuerpos anti- PA $\geq 1/180$ y/o ELA $\geq 1/240$ y/o ETA $\geq 1/800$

Si la PCR *gyrB* se combina con los resultados de la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos (puntos de corte colonizado) también son significativas las diferencias con respecto al control microbiológico habitual cuando se consideran positivos los pacientes con una o más técnicas positivas ($p < 0,001$) o con dos o más técnicas ($p < 0,05$). Las diferencias no son significativas cuando se compara el tiempo hasta el primer resultado positivo entre la PCR *gyrB* aislada y la combinada con las técnicas de detección de anticuerpos.

En la Figura 4.3.4.3 se refleja el número de pacientes del grupo B en los que se detecta el primer resultado positivo al inicio, durante el primer o el segundo año de seguimiento para cada una de las técnicas, comparadas con el control microbiológico habitual.

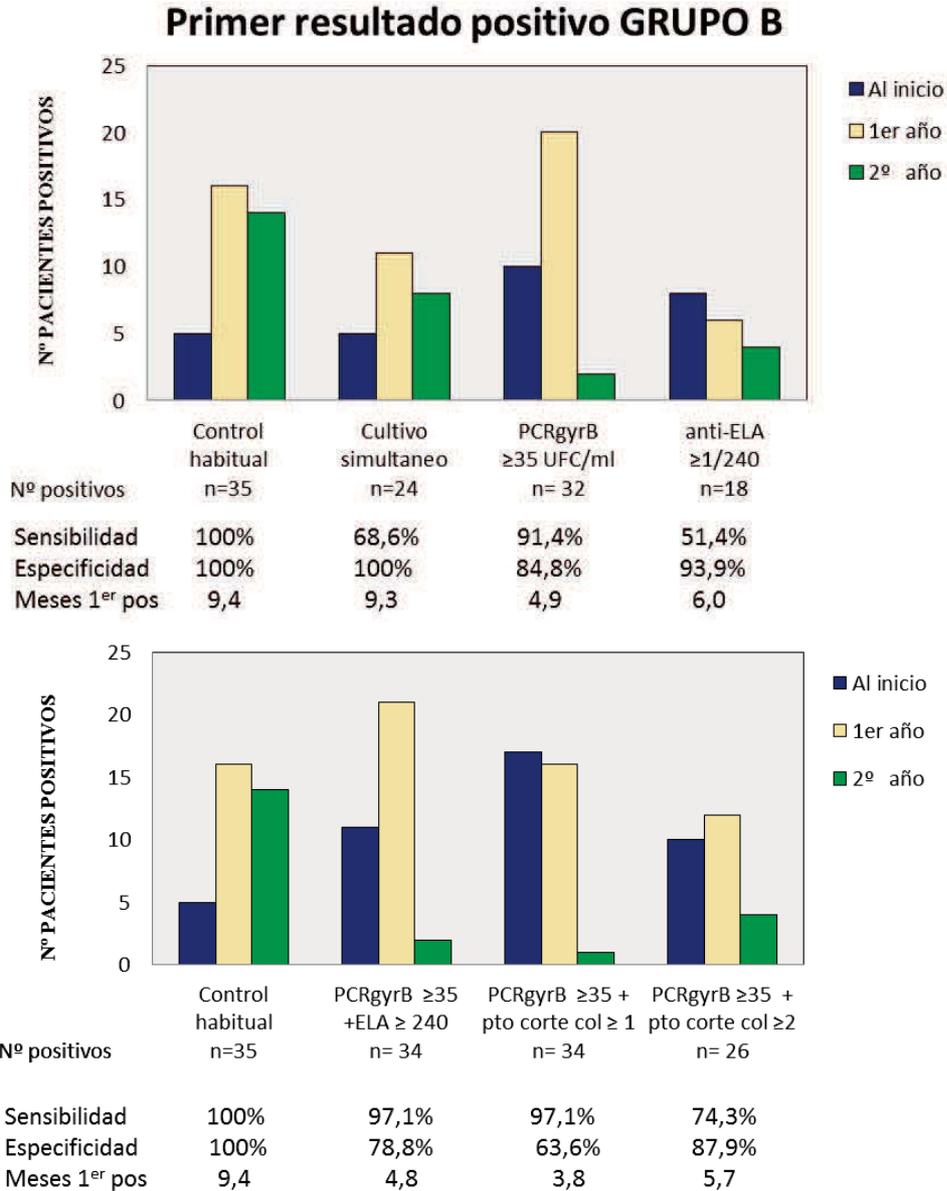


Figura 4.3.4.3. Distribución del número de pacientes del grupo B según el periodo de hallazgo del primer resultado positivo. Grupo B, 35 pacientes con aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado. Para cada técnica se indica el número total de positivos, sensibilidad, especificidad y media de meses en obtener el primer resultado positivo.

Los resultados más equilibrados se alcanzan con la PCRgyrB aislada o combinada con la detección de anticuerpos anti-ELA ya que tienen la mejor sensibilidad (91,4% y 97,1%) con una especificidad aceptable (84,8 y 78,8%) y con una media del tiempo en obtener el primer resultado positivo menor (4,8 y 4,9) que con el cultivo (9,4 meses).

4.3.5. Resumen de los mejores resultados de las pruebas individuales y combinadas

En las Tabla-4.3.5.1 se exponen los mejores resultados de las técnicas de PCR y detección de anticuerpos, valoradas individualmente o en combinación, y se comparan con los resultados del cultivo aislado.

Tabla 4.3.5.1. Comparación de los resultados del cultivo con las técnicas individuales o combinadas con los mejores resultados

Aislamiento <i>P.aeruginosa</i> ¹ (24 meses seguimiento)		Cultivo positivo ³ <i>P.aeruginosa</i>	PCRgyrB ≥ 35UFC/ml	PCRgyrB ≥ 35 UFC/ml ⁴			
				y/o ELA ≥ 1/240		y/o Punto corte COLONIZADO	
				Pos ≥ 1	Pos ≥ 1	Pos ≥ 2	
Grupo- A(n=33)	No	0(0,0)	5(15,2)	7(21,2)	12(36,4)	4(12,1)	
Grupo-B1(n=15)	Sí, 1 muestra	7(46,7)	13(86,7)	14(93,3)	14(93,3)	10(66,7)	
Grupo-B2(n=20)	Sí, ≥ 2 muestras	17(85,0)	19(95,0)	20(100)	20(100)	16(80,0)	
TOTAL(n=68)	35 (51,5)	24(35,3)	37(54,4)	41(60,3)	46(67,6)	30(44,1)	
<i>S</i> ²		68,6 (52,0-81,4)	91,4 (77,6-97,0)	97,1 (85,5-99,5)	97,1 (85,5-99,5)	74,3 (57,9-85,8)	
<i>E</i> ²		100 (89,6-100)	84,8 (69,1-93,3)	78,8 (62,2-89,3)	63,6 (46,6-77,8)	87,9 (72,7-95,2)	
<i>VPP</i> ²		100 (86,2-100)	86,5 (72,0-94,1)	82,9 (68,7-91,5)	73,9 (59,7-84,4)	86,7 (70,3-94,7)	
<i>VPN</i> ²		75,0 (60,6-85,4)	90,3 (75,1-96,7)	96,3 (81,7-99,3)	95,5 (78,2-99,2)	76,3 (60,8-87,0)	
<i>Ex</i> ²		83,8 (73,3-90,7)	88,2 (78,5-93,9)	88,2 (60,4-81,3)	80,9 (70,0-88,5)	80,9 (70,0-88,5)	
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
<i>Tiempo hasta 1er positivo</i> ⁵		9,3	4,9	4,8	3,8	5,7	

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes con dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado. N° positivos (porcentaje respecto al total de cada grupo)

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³Numero pacientes con cultivo convencional positivo en las muestras obtenidas simultáneamente.

⁴Numero pacientes con valores promedio de la PCRgyrB ≥ 35 UFC/ml y/o del título de anticuerpos anti- PA ≥ 1/180 ELA ≥ 1/240 y/o ETA ≥ 1/800 (porcentaje respecto al total del cada grupo) según el número de técnicas positivas.

⁵ Para los pacientes del grupo B. Desde el inicio del seguimiento, en meses.

Los mejores resultados se obtienen con la técnica de PCRgyrB ≥ 35 UFC/ml sola o combinada con las técnicas serológicas. Los mejores resultados de exactitud (88,2%) son para la PCR sola o combinada con la detección de anticuerpos anti-ELA y mejores que el cultivo (83,8%). Las mejores sensibilidad (97,1%) y VPN (96,3%) con la combinación de PCRgyrB y anticuerpos anti-ELA y son también muy superiores a las del cultivo (68,6% y

75,0%, respectivamente). Las mejores especificidad y VPP se obtienen con la PCR_{gyrB} (84,8% y 86,5%, respectivamente) y con la combinación de las tres técnicas de detección de anticuerpos combinadas con la PCR_{gyrB} cuando se valora como positivo a partir de dos técnicas positivas (87,9% y 86,7%). Como ya se ha comentado, especificidad y VPP son inferiores a las del cultivo aislado puesto que este tiene siempre el 100%.

En la Tabla-4.3.5.2 se valoran los resultados del cultivo combinado con las técnicas de PCR o de detección de anticuerpos con los mejores resultados y se comparan con los resultados del cultivo aislado.

Tabla 4.3.5.2. Comparación de los resultados del cultivo aislado o combinado con las técnicas de detección de anticuerpos o del DNA con los mejores resultados

Aislamiento <i>P.aeruginosa</i> ¹ en 24 meses seguimiento		Cultivo positivo <i>P.aeruginosa</i> ³	Cultivo y/o PCR _{gyrB} ≥ 35UFC/ml	Cultivo y/o PCR GyrB ≥ 35 UFC/ml ⁴			
				y/o ELA ≥ 1/240		y/o Punto corte COLONIZADO	
				Pos ≥ 1	Pos ≥ 2	Pos ≥ 1	Pos ≥ 2
Grupo-A (n=33)	No	0(0,0)	5(15,2)	7(21,2)	0(0)	12(36,4)	4(12,1)
Grupo-B1 (n=15)	Sí, 1 muestra	7(46,7)	13(86,7)	14(93,3)	9(60,0)	14(93,3)	10(66,7)
Grupo-B2 (n=20)	Sí, ≥ 2 muestras	17(85,0)	20(100,0)	20(100)	20(100)	20(100)	20(100)
TOTAL (n=68)	35 (51,5)	24(35,3)	38(54,4)	41(60,3)	29(42,7)	46(67,7)	34(50,0)
<i>S</i> ²		68,6 (52,0-81,4)	93,9 (80,4-98,3)	97,1 (85,5-99,5)	82,9 (67,3-91,9)	97,1 (85,5-99,5)	85,7 (70,6-93,7)
<i>E</i> ²		100 (89,6-100)	84,8 (69,1-93,3)	78,8 (62,2-89,3)	100 (89,6-100)	63,6 (46,6-77,8)	87,9 (72,7-95,2)
<i>VPP</i> ²		100 (86,2-100)	86,1 (71,3-93,9)	82,9 (68,7-91,5)	100 (88,3-100)	73,9 (59,7-84,4)	88,2 (73,4-95,3)
<i>VPN</i> ²		75,0 (60,6-85,4)	93,3 (78,7-98,2)	96,3 (81,7-99,3)	84,6 (70,3-92,8)	95,5 (78,2-99,2)	85,3 (69,9-93,6)
<i>Ex</i> ²		83,8 (73,3-90,7)	89,4 (79,7-94,8)	88,2 (60,4-81,3)	91,2 (82,1-95,9)	80,9 (70,0-88,5)	86,8 (76,7-92,9)
<i>p</i>		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Tiempo hasta 1er positivo</i> ⁵		9,3	4,8	4,6	7,1	3,8	6,0

¹Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes con dos o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizados. N° positivos (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

²S=Sensibilidad, E=Especificidad, VPP= Valor Predictivo Positivo, VPN=Valor Predictivo Negativo, Ex=exactitud. En porcentaje (Intervalo de confianza 95%).

³Numero pacientes con cultivo convencional positivo en las muestras obtenidas simultáneamente.

⁴Numero pacientes con cultivo positivo y/o valores promedio del título de anticuerpos anti- PA ≥ 1/180 y/o ELA ≥ 1/240 y/o ETA ≥ 1/800 y/o la PCR_{gyrB} ≥ 35 UFC/ml (porcentaje respecto al total del cada grupo) según el número de técnicas positivas.

⁵ Para los pacientes del grupo B. Desde el inicio del seguimiento, en meses.

Cuando el cultivo se complementa con las técnicas de PCR y serología, los resultados de sensibilidad, VPN y exactitud mejoran con respecto a los resultados del cultivo aislado excepto en el caso de la combinación de cultivo, PCR $gyrB$ y las tres técnicas de detección de anticuerpos cuando se aplica el criterio menos restrictivo y se consideran positivos todos los pacientes con al menos una de las técnicas positivas.

Globalmente, los mejores resultados se obtienen al complementar el cultivo con la técnica de PCR $gyrB$ \geq 35 UFC/ml sola o combinada con la detección de anticuerpos anti-ELA. La sensibilidad (97,1%) y el VPN (96,3%) son mejores con la combinación de cultivo, PCR $gyrB$ y anticuerpos anti-ELA, considerando positivos los pacientes con cualquiera de estas pruebas positivas. De esta forma se obtienen valores de sensibilidad y VPN muy superiores a los del cultivo aislado (68,6% y 75,0%, respectivamente). Los mejores resultados de especificidad (100%), VPP (100%) y de exactitud (91,2%) se obtienen combinando cultivo, PCR $gyrB$ y la detección de anticuerpos anti-ELA cuando se consideran positivos los pacientes con al menos dos de las pruebas positivas. También son mejores que los del cultivo aislado (100%, 100% y 83,8%, respectivamente). Cuando se combinan el cultivo con la PCR $gyrB$ y la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos, los resultados son muy equilibrados, todos por encima del 85%, pero ni sensibilidad ni especificidad son las mejores.

En la Tabla 4.3.5.3 se resumen los resultados de los 5 pacientes del grupo A con todos los cultivos negativos pero en los que el valor promedio de la PCR $gyrB$ fue \geq 35 UFC/ml durante el seguimiento de 24 meses analizado.

Tabla 4.3.5.3. Resultados de los pacientes del Grupo A sin aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo y valores promedio de PCR_{gyrB} ≥ 35 UFC/ml durante los 24 meses de seguimiento analizado.

<i>Antecedentes de Colonización</i> ¹	<i>Nunca</i>	<i>Inicial</i>	<i>Intermitente</i>	<i>Crónica</i>	<i>Inicial</i>
<i>Colonización 12 m previos</i> ¹	<i>NO</i>	<i>Inicial</i>	<i>Intermitente</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>
<i>Colonización 12 m posteriores</i> ³	<i>Inicial</i>	<i>Inicial</i>	<i>NO</i>	<i>Intermitente</i>	<i>Intermitente</i>
<i>Nº total muestras cultivo</i> ²	<i>10</i>	<i>12</i>	<i>19</i>	<i>20</i>	<i>17</i>
<i>Meses último cultivo+ a PA</i> ¹	<i>Nunca</i>	<i>11</i>	<i>9</i>	<i>19</i>	<i>27</i>
<i>Meses siguiente cultivo+ a PA</i> ³	<i>4</i>	<i>1</i>	<i>NO</i>	<i>1</i>	<i>7</i>
<i>Otros gérmenes</i> ^{2 y 4}	<i>Sa</i> <i>ENTB</i>	<i>Sa</i>	<i>Sa, Lev</i> <i>ENTB</i>	<i>Sa, Hi, Ho</i> <i>2BGNnoF</i>	<i>Sa, Ho, Lev</i> <i>ENTB,</i> <i>BGNnoF</i>
<i>Nº total muestras PCR y serología</i> ²	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>9</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
<i>-PCR gyrB (promedio UFC/muestra)</i> ²	<i>1400</i>	<i>40</i>	<i>125</i>	<i>1285</i>	<i>220</i>
<i>-PCR toxA (promedio UFC/muestra)</i> ²	<i>2245</i>	<i>Neg</i>	<i>100</i>	<i>255</i>	<i>215</i>
<i>-anti PA (promedio título Ac)</i> ²	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
<i>-anti ELA (promedio título Ac)</i> ²	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
<i>-anti ETA (promedio título Ac)</i> ²	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>

¹ A la primera muestra analizada

² Durante los 24 meses de seguimiento analizado.

³ A la última muestra analizada del seguimiento

⁴ Sa=S.aureus, Hi=H.influenzae, Ho=hongos, Lev= levaduras, ENTB= enterobacterias, BGNnoF= Bacilo Gram negativo no fermentador.

⁵Valores promedio del título de anticuerpos anti- PA y/o ELA y/o ETA.

De los 5 pacientes, 4 tenían la PCR_{toxA} (≥ 20 UFC/ml) también positiva. En 4 de los 5 pacientes se aisló *P.aeruginosa* por cultivo en los 12 meses siguientes a la última muestra analizada (entre 1 y 7 meses después) y en todos ellos se aislaron varios microorganismos por cultivo. Respecto al tratamiento antibiótico durante el periodo de seguimiento, 1 había recibido azitromicina y 3 tratamiento específico frente a *P.aeruginosa*. Respecto al título de anticuerpos, los 5 eran negativos frente a los tres antígenos.

En la Tabla 4.3.5.4 se resumen algunas características de los 3 pacientes del grupo B en los que el valor promedio de la PCR_{gyrB} durante el periodo de seguimiento de 24 meses fue inferior a 35 UFC/ml.

Tabla 4.3.5.4. Resultados de los tres pacientes del Grupo B con aislamiento de *P.aeruginosa* por cultivo y valores promedio de PCR_{gyrB} inferiores a 35 UFC/ml durante los 24 meses de seguimiento analizado.

GRUPO	B2	B1	B1
<i>Antecedentes de Colonización</i> ¹	<i>Inicial</i>	<i>Inicial</i>	<i>Inicial</i>
<i>Colonización 12 m previos</i> ¹	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>
<i>Colonización 12 m posteriores</i> ³	<i>Intermitente</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>
<i>Nº total muestras cultivo</i> ²	<i>12</i>	<i>11</i>	<i>14</i>
<i>Nº muestras positivas por cultivo</i> ²	<i>2</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
<i>Meses último cultivo+ a PA</i> ¹	<i>13</i>	<i>22</i>	<i>18</i>
<i>Meses siguiente cultivo+ a PA</i> ³	<i>11</i>	<i>NO</i>	<i>15</i>
<i>Otros gérmenes</i> ^{2 y 4}	<i>Sa, Lev, BGNnoF</i>	<i>NO</i>	<i>Sa, HI, Lev</i>
<i>Nº total muestras PCR y serología</i> ²	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>5</i>
<i>-PCR gyrB (promedio UFC/ml)</i> ²	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
<i>-PCR toxA (promedio UFC/ml)</i> ²	<i>240</i>	<i>Neg</i>	<i>80</i>
<i>-anti PA (promedio título Ac)</i> ²	<i>1/1220</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
<i>-anti ELA (promedio título Ac)</i> ²	<i>1/275</i>	<i>Neg</i>	<i>1/710</i>
<i>-anti ETA (promedio título Ac)</i> ²	<i>1/2265</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>

¹ A la primera muestra analizada

² Durante los 24 meses de seguimiento analizado.

³ A la última muestra analizada del seguimiento

⁴ Sa= *S.aureus*, Hi= *H.influenzae*, Ho=hongos, Lev= levaduras, ENTB= Enterobacterias, BGNnoF= Bacilo Gram negativo no fermentador.

⁵Valores promedio del título de anticuerpos anti- PAy/o ELA \geq 1/240 y/o ETA \geq 1/800.

En 2 de los 3 pacientes, la PCR_{toxA} (\geq 20 UFC/ml) fue positiva, se volvió a aislar *P.aeruginosa* por cultivo después de la última muestra analizada (11 y 15 meses después), tenían anticuerpos anti ELA a un título superior a 1/240 y se aislaron otros microorganismos por cultivo. En el paciente que sufrió colonización intermitente durante los 12 meses posteriores a la última muestra analizada, el promedio del título de anticuerpos fue positivo también frente a PA (1/1220) y ETA (1/2265).

4.3.6. Resultados de la detección de DNA y anticuerpos específicos en el diagnóstico de la colonización crónica por *P.aeruginosa*. Comparación con los resultados el cultivo

En el diagnóstico de la colonización crónica durante los 24 meses de seguimiento analizado se han evaluado los resultados de las técnicas de PCR y detección de anticuerpos, individuales o combinadas. Se han utilizado los criterios que habían obtenido los mejores resultados en el análisis en pacientes estables microbiológicamente. En la Tabla 4.3.6.1 se detallan las técnicas y los puntos de corte utilizados para cada una de ellas en el diagnóstico de la colonización crónica por *P.aeruginosa*.

Tabla 4.3.6.1 Criterios de positividad para las técnicas de detección de anticuerpos y PCR

Diagnóstico Colonización crónica	
Detección anticuerpos ^{1,2}	- <i>ETA</i> $\geq 1/1900$ - <i>Pto. corte</i> 1/1250 - <i>Pto. corte CRÓNICO</i>
Pruebas combinadas ^{2,3}	- <i>Pto. corte</i> 1/1250 y/o <i>PCRgyrB</i> ≥ 5000 UFC / ml - <i>Pto. corte CRÓNICO</i> y/o <i>PCRgyrB</i> ≥ 5000 UFC/ ml

¹PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo.

²Punto de corte CRÓNICO: Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos, utilizando los puntos de corte individuales PA $\geq 1/1900$ y/o ELA $\geq 1/1500$ y/o ETA $\geq 1/1900$. Se ha considerado como positivo a partir de uno o más (≥ 1) y de dos o más (≥ 2) técnicas positivas.

³Se han valorado conjuntamente los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos y la técnica de *PCRgyrB* de *P.aeruginosa*, utilizando el punto de corte ≥ 5000 UFC/ml. Se ha considerado como positivo a partir de dos o más (≥ 1) y de tres o más (≥ 2) técnicas positivas.

Durante los 24 meses del periodo de seguimiento analizado, únicamente dos pacientes del grupo B cumplían criterios de colonización crónica por *P.aeruginosa* según los resultados del cultivo del seguimiento microbiológico habitual, lo que representa una prevalencia del 2,9%. Este bajo número de pacientes con colonización crónica no ha permitido un análisis estadístico de los resultados por lo que se han analizado individualmente. En la Tabla-4.3.6.2 se detallan los resultados de estos dos pacientes.

Tabla 4.3.6.2. Resultados de los dos pacientes del Grupo B con colonización crónica por *P.aeruginosa* según resultados del cultivo en los 24 meses de seguimiento analizado.

<i>Antecedentes de Colonización</i> ¹	<i>Inicial</i>	<i>Crónica</i>
<i>Colonización 12 m previos</i> ¹	<i>Inicial</i>	<i>Crónica</i>
<i>Colonización 12 m posteriores</i> ³	<i>NO</i>	<i>Crónica</i>
<i>Nº total muestras cultivo</i> ²	<i>13</i>	<i>9</i>
<i>Nº muestras positivas por cultivo</i> ²	<i>8</i>	<i>5</i>
<i>Meses último cultivo+ a PA</i> ¹	<i>9</i>	<i>0</i>
<i>Meses siguiente cultivo+ a PA</i> ³	<i>NO</i>	<i>4</i>
<i>Otros gérmenes</i> ^{2y4}	<i>Sa, Lev, ENTB</i>	<i>Sa, BGNnoF</i>
<i>Nº total muestras PCR y serología</i> ²	<i>8</i>	<i>8</i>
<i>-PCR gyrB (promedio UFC/ml)</i> ²	<i>2850</i>	<i>24600</i>
<i>-PCR toxA (promedio UFC/ml)</i> ²	<i>8980</i>	<i>31000</i>
<i>-anti PA (promedio título Ac)</i> ^{2,5}	<i>1/780</i>	<i>Neg</i>
<i>-anti ELA (promedio título Ac)</i> ²	<i>1/415</i>	<i>Neg</i>
<i>-anti ETA (promedio título Ac)</i> ²	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>

¹ Al inicio del seguimiento.

² Durante los 24 meses de seguimiento.

³ Al final del seguimiento

⁴ Sa= *S.aureus*, Hi= *H.influenzae*, Ho=hongos, Lev= levaduras, ENTB= Enterobacterias, BGNnoF= Bacilo Gram negativo no fermentador.

⁵ Valores promedio del título de anticuerpos anti- PA \geq 1/180 y/o ELA \geq 1/240 y/o ETA \geq 1/800.

Ninguno de los dos pacientes cumplía criterios de colonización crónica por las técnicas de detección de anticuerpos y PCR evaluadas. En uno de los pacientes, los resultados tanto de la PCR $gyrB$ como de la detección de anticuerpos cumplían criterios de colonización actual pero no crónica y el paciente no presentó ningún aislamiento de *P.aeruginosa* al menos durante los dos años posteriores a la última muestra analizada en el seguimiento. En el otro paciente, el promedio de la PCR $gyrB$ fue positivo a recuentos superiores a 5000 UFC/ml pero no tenía anticuerpos frente a ninguno de los antígenos. Este paciente cumplía criterios de colonización crónica por *P.aeruginosa* según los resultados del cultivo en el seguimiento microbiológico habitual tanto en los 12 meses previos a la primera muestra del seguimiento, durante los 24 meses de seguimiento evaluados y en el año siguiente a la última muestra analizada. Sin embargo tenía una situación clínica normal y FEV1 igual o superior al 80% aunque con presencia de BQ.

En la Tabla-4.3.6.3 se exponen los resultados de cada una de las técnicas y criterios de positividad evaluados para el diagnóstico de colonización crónica.

Tabla-4.3.6.3. Resultados obtenidos con las técnicas individuales o combinadas con los mejores resultados para el diagnóstico de la colonización crónica por *P.aeruginosa*

Aislamiento crónico <i>P.aeruginosa</i> ¹ en 24 meses seguimiento		ETA ² ≥ 1/1900	PA y/o ELA y/o ETA ≥ 1/1250 ²		PA≥1900 y/o ELA≥ 1500 y/o ETA≥1900 ²		
			-	y/o PCRgyrB ≥ 5000 UFC /ml	-		y/oPCRgyrB ≥5000 UFC /ml
			POS≥ 2	POS≥ 3	POS≥ 1	POS≥ 2	POS≥ 3
Grupo-A (n=33)	0	1 (3,0)	0	0	2 (6,1)	0	0
Grupo-B1 (n=15)	0	0	0	0	0	0	0
Grupo-B2 (n=20)	2 (10)	4 (20)	0	0	6 (30,0)	0	0
TOTAL(n=68)	2 (2,9)	5 (7,4)	0	0	8 (11,8)	0	0

¹ Grupo-A, 33 pacientes sin aislamientos de *P.aeruginosa*; Grupo-B1, 15 pacientes con un único aislamiento de *P.aeruginosa*. Grupo-B2, 20 pacientes 2 o más aislamientos de *P.aeruginosa* durante el periodo de seguimiento de 24 meses. N° muestras (porcentaje respecto al total de muestras de cada grupo)

² PA= Proteasa alcalina, ELA= Elastasa, ETA= Exotoxina A. Valor inverso del título de anticuerpos a partir del cual el resultado se considera positivo. N° positivos a 1 o más (≥1), 2 o más (≥2), 3 o más (≥3) técnicas (porcentaje respecto al total de cada grupo)

El mayor número de positivos, 8 pacientes (2 del grupo A y 6 del grupo B) se identifican con las técnicas de detección de anticuerpos utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROC (PA≥ 1900 y/o ELA≥ 1500 y/o ETA≥ 1900) y el criterio de positividad de la presencia de anticuerpos frente al menos uno de los tres antígenos. De los 8 pacientes 5 (1 del grupo A y 4 del grupo B) tenían anticuerpos anti-ETA a títulos igual o superiores a 1/1900. En la Tabla-4.3.6.4 A y B se exponen los resultados de estos 8 pacientes. Ninguno cumplía criterios de colonización crónica con ninguno de los otros 4 criterios evaluados.

En la Tabla-4.3.6.4A se han agrupado los cuatro pacientes que tenían anticuerpos frente al menos uno de los tres antígenos utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROC (PA≥ 1900 y/o ELA≥ 1500 y/o ETA≥ 1900) y resultados de PCRgyrB iguales o superiores a 5000 UFC/ml.

Tabla-4.3.4.4A Resultados de los pacientes identificados con colonización crónica por *P.aeruginosa* utilizando el criterio $PA \geq 1/1900$ y/o $ELA \geq 1/1500$ y/o $ETA \geq 1/1900$

GRUPO	B2	B2	B2	B2
<i>Antecedentes de Colonización</i> ¹	<i>Intermitente</i>	<i>Intermitente</i>	<i>Intermitente</i>	<i>Intermitente</i>
<i>Colonización 12 m previos</i> ¹	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>
<i>Colonización 12 m posteriores</i> ³	<i>NO</i>	<i>Intermitente</i>	<i>Crónica</i>	<i>Intermitente</i>
<i>Nº total muestras cultivo</i> ²	9	10	18	21
<i>Nº muestras positivas por cultivo</i> ²	3	2	8	3
<i>Meses último cultivo+ a PA</i> ¹	28	19	18	16
<i>Meses siguiente cultivo+ a PA</i> ³	15	2	1	7
<i>Otros gérmenes</i> ^{2y4}	<i>Sa, HO, ENTB</i>	<i>Sa, ENTB</i>	<i>Sa, Lev, ENTB, BGNnoF</i>	<i>Sa, HO, Lev, ENTB, BGNnoF</i>
<i>Nº total muestras PCR y serología</i> ²	6	6	6	6
<i>-PCR gyrB (promedio UFC/ml)</i> ²	13350	38900	120000	8500
<i>-PCR toxA (promedio UFC/ml)</i> ²	26870	54800	145000	32000
<i>-anti PA (promedio título Ac)</i> ²	1/885	1/950	1/210	1/540
<i>-anti ELA (promedio título Ac)</i> ²	1/6150	1/240	<i>Neg</i>	1/1850
<i>-anti ETA (promedio título Ac)</i> ²	<i>Neg</i>	1/1900	1/2815	1/870

¹ Al inicio del seguimiento.

² Durante los 24 meses de seguimiento.

³ Al final del seguimiento

⁴ Sa= *S.aureus*, Hi= *H.influenzae*, Ho=hongos, Lev= levaduras, ENTB= Enterobacterias, BGNnoF= Bacilo Gram negativo no fermentador.

⁵ Valores promedio del título de anticuerpos anti- $PA \geq 1/180$ y/o $ELA \geq 1/240$ y/o $ETA \geq 1/800$.

Todos ellos tenían antecedentes de colonización intermitente aunque no estuvieron colonizados durante el año anterior a la primera muestra analizada en los 24 meses del seguimiento. En todos ellos se aisló *P.aeruginosa* en más de una muestra durante el periodo de seguimiento analizado. En los tres en los que se aisló *P.aeruginosa* en el año posterior a la última muestra analizada en el seguimiento (1, 2 y 7 meses después) tenían un promedio del título de anticuerpos anti-ETA $\geq 1/800$. El único paciente en el que la colonización posterior fue crónica, tenía el título de anticuerpos anti ETA y el recuento de la PCR $_{gyrB}$ más elevados. En el cuarto paciente no se aisló *P.aeruginosa* en el año posterior a la última muestra del seguimiento y el título de anticuerpos anti ETA fue negativo.

En la Tabla-4.3.4.4B se han agrupado los cuatro pacientes que tenían anticuerpos frente al menos uno de los tres antígenos utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROC ($PA \geq 1900$ y/o $ELA \geq 1500$ y/o $ETA \geq 1900$) y resultados de PCR $_{gyrB}$ negativos o inferiores a 5000 UFC/ml. Ninguno de ellos estuvo colonizado durante el año anterior al inicio del seguimiento de 24 meses. En uno de ellos nunca se había aislado *P.aeruginosa*

previamente ni se volvió a aislar al menos en los dos años posteriores a la última muestra del seguimiento analizada y el título de anticuerpos anti ETA fue negativo. De los otros tres pacientes, uno tenía antecedentes de colonización inicial y dos intermitente, En los tres se aisló *P.aeruginosa* en el año posterior al final del seguimiento (3 y 11 meses después) y todos ellos tenían, un promedio del título de anticuerpos anti-ETA $\geq 1/1900$.

Tabla-4.3.4.4B. Características de los pacientes identificados con colonización crónica por *P.aeruginosa* utilizando el criterio $PA \geq 1/1900$ y/o $ELA \geq 1/1500$ y/o $ETA \geq 1/1900$

GRUPO	B2	A	A	B2
<i>Antecedentes de Colonización</i> ¹	<i>Inicial</i>	<i>Nunca</i>	<i>Intermitente</i>	<i>Intermitente</i>
<i>Colonización 12 m previos</i> ¹	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>	<i>NO</i>
<i>Colonización 12 m posteriores</i> ³	<i>Intermitente</i>	<i>NO</i>	<i>Intermitente</i>	<i>Intermitente</i>
<i>Nº total muestras cultivo</i> ²	<i>12</i>	<i>11</i>	<i>30</i>	<i>17</i>
<i>Nº muestras positivas por cultivo</i> ²	<i>2</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>3</i>
<i>Meses último cultivo+ a PA</i> ¹	<i>13</i>	<i>NO</i>	<i>58</i>	<i>22</i>
<i>Meses siguiente cultivo+ a PA</i> ³	<i>11</i>	<i>NO</i>	<i>3</i>	<i>11</i>
<i>Otros gérmenes</i> ^{2y4}	<i>Sa, Lev, BGNnoF</i>	<i>Sa</i>	<i>Sa, HO, Lev BGNnoF</i>	<i>Sa, HO, ENTB</i>
<i>Nº total muestras PCR y serología</i> ²	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>7</i>	<i>5</i>
<i>-PCR gyrB (promedio UFC/ml)</i> ²	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>3670</i>
<i>-PCR toxA (promedio UFC/ml)</i> ²	<i>240</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>	<i>100</i>
<i>-anti PA (promedio título Ac)</i> ²	<i>1/1220</i>	<i>1/285</i>	<i>1/415</i>	<i>Neg</i>
<i>-anti ELA (promedio título Ac)</i> ²	<i>1/275</i>	<i>1/2540</i>	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
<i>-anti ETA (promedio título Ac)</i> ²	<i>1/2265</i>	<i>Neg</i>	<i>1/1900</i>	<i>1/4455</i>

¹ Al inicio del seguimiento.

² Durante los 24 meses de seguimiento.

³ Al final del seguimiento

⁴ Sa= *S.aureus*, Hi= *H.influenzae*, Ho=hongos, Lev= levaduras, ENTB= Enterobacterias, BGNnoF= Bacilo Gram negativo no fermentador.

⁵ Valores promedio del título de anticuerpos anti- PA y/o ELA y/o ETA.

En 6 de los 8 pacientes con título de anticuerpos anti *P.aeruginosa* frente $PA \geq 1/1900$ y/o $ELA \geq 1/1500$ y/o $ETA \geq 1/1900$ se identificó colonización por *P.aeruginosa* en el año posterior al final del seguimiento. En los 6 el título de anticuerpos anti ETA fue positivo y en 5 de ellos $\geq 1/1900$.

5. DISCUSIÓN

El diagnóstico y seguimiento microbiológico de la colonización por *P.aeruginosa* es de gran relevancia para el control clínico de los pacientes con FQ. La identificación precoz de los pacientes colonizados por este microorganismo es importante para el inicio de un tratamiento adecuado que permita su erradicación^{22, 48, 49}.

El control microbiológico se inicia en la actualidad muy precozmente ya que los pacientes se diagnostican de FQ en la mayoría de los casos durante el periodo neonatal y por tanto la proporción de niños pequeños es elevada. En este trabajo la mayoría de pacientes se había diagnosticado en el primer año de vida. Varía entre el 75-79% según se tengan en cuenta el estudio con muestras de 116 pacientes estables microbiológicamente o el estudio con muestras de 68 pacientes con 24 meses del seguimiento analizado. La media de edad es baja y fluctúa entre 8,2 años en el momento de la obtención de la muestra analizada en el primer estudio y 6,4 años al obtener la primera muestra analizada en el segundo estudio.

La corta edad de los pacientes imposibilita la obtención de esputo expectorado o inducido para realizar el cultivo por lo que en la mayoría de centros se utiliza el exudado faríngeo como alternativa⁸³ en el seguimiento microbiológico habitual de los pacientes. En este trabajo, en el 72% de los 68 pacientes con un seguimiento de 24 meses los cultivos se habían realizado principalmente a partir de exudado faríngeo. El porcentaje es menor (62%) en el estudio en pacientes estables microbiológicamente puesto que la proporción de pacientes de más edad y por tanto capaces de expectorar, es mayor.

Aunque la flora faríngea se presupone representativa de los microorganismos presentes en el bronquio, los estudios en los que se comparan exudado faríngeo y esputo o lavado bronco-alveolar muestran una sensibilidad variable y en general baja para el aislamiento de *P.aeruginosa* con los resultados de una sola muestra de exudado faríngeo, mientras que la especificidad es en general buena⁵³⁻⁵⁸. La sensibilidad del exudado faríngeo mejora si se repite y por tanto es una muestra adecuada para el seguimiento de la colonización por *P.aeruginosa* cuando no se dispone de esputo. En este trabajo, la sensibilidad del cultivo de exudado faríngeo para identificar colonización por *P.aeruginosa* ha sido también baja. Varía entre el 44% con los resultados de una sola muestra en el análisis

de las muestras de pacientes estables microbiológicamente y el 69% con una media de 7 muestras en los 68 pacientes en los que se evaluó un periodo de 24 meses de seguimiento.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar la utilidad, en el diagnóstico de la colonización por *P.aeruginosa* y en la diferenciación de la colonización crónica, de técnicas independientes respecto al cultivo convencional, como la detección del DNA de la bacteria en muestras de exudado faríngeo o la determinación de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* en suero. Uno de los problemas en la evaluación de estas pruebas es la falta de referencias para su validación. En este trabajo, se ha evaluado la capacidad de estas técnicas para identificar correctamente el estatus de colonización de los pacientes. Para definir el estatus de colonización se han utilizado los resultados de todos los cultivos del control microbiológico habitual y se han empleado los criterios de Lee ⁶⁷, que definen la colonización crónica cuando más del 50% de los cultivos son positivos. Para evaluar la capacidad de la detección del DNA de *P.aeruginosa* y la determinación de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* para identificar el estatus de colonización de los pacientes, los resultados obtenidos con estas técnicas se han comparado con los resultados del cultivo de las muestras obtenidas simultáneamente. A nuestro juicio, esto permite valorar correctamente la sensibilidad de estas técnicas respecto del cultivo, pero continúa siendo más difícil evaluar su especificidad puesto que los resultados del cultivo se utilizan para definir el estatus de colonización y por tanto el cultivo siempre disfruta de un 100% de especificidad.

El estudio para seleccionar los mejores puntos de corte, tanto para las técnicas de PCR como para las de detección de anticuerpos, se ha realizado con los resultados de 116 muestras de pacientes estables microbiológicamente. La definición del estatus de colonización, teniendo en cuenta tanto los 12 meses previos como los 12 posteriores a la obtención de cada muestra incluida en el estudio, ha permitido una separación clara entre pacientes colonizados y no colonizados y entre los que tenían o no colonización crónica. Esta separación clara también se refleja en las características de cada uno de los grupos con diferente estatus de colonización por *P.aeruginosa*, entre los cuales se observan diferencias estadísticamente significativas en la media de edad, el número de cultivos totales y la proporción de exudados faríngeos procesados en el control microbiológico habitual así como

en la proporción de pacientes homocigotos para la mutación F508del, la proporción de pacientes con bronquiectasias, FEV1 inferior al normal o una situación clínica normal o leve y naturalmente el haber o no recibido tratamiento antibiótico activo frente a *P.aeruginosa*.

Una vez seleccionados los puntos de corte para la detección del DNA de *P.aeruginosa* y la determinación de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* se realizó un análisis de los resultados de cultivo, PCR y serología en 471 muestras de 68 pacientes de los que se disponía de resultados de las tres técnicas durante un periodo mínimo de 24 meses. En este caso, los 68 pacientes se distribuyeron en dos grupos según se hubiera o no aislado *P.aeruginosa* en el control microbiológico habitual durante ese periodo. Los dos grupos de pacientes son muy homogéneos ya que solo se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en si habían recibido o no antibióticos con actividad específica frente a *P.aeruginosa* y naturalmente en el aislamiento o no de *P.aeruginosa* durante los 24 meses analizados. Conviene señalar que en el grupo de pacientes sin aislamiento durante los 24 meses de seguimiento analizados, el 21,2% habían recibido Azitromicina y el 33,3% algún tratamiento con actividad frente a *P.aeruginosa*.

El papel de la detección de anticuerpos frente a *P.aeruginosa* como indicador precoz de colonización es controvertido, sobre todo por la falta de técnicas comerciales estandarizadas. Su utilización no se recomienda universalmente aunque en determinados países pioneros en el tratamiento agresivo de la colonización inicial por *P.aeruginosa* se recomienda su realización periódica o al menos anualmente en niños pequeños⁸³. En este estudio se han reevaluado los resultados de una técnica comercializada (anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA de Mediagnost®, Reutlingen, Alemania) para la detección del título de anticuerpos frente a tres antígenos de *P.aeruginosa*, proteasa alcalina, elastasa y exotoxina A. Los resultados de esta técnica, recomendados inicialmente para el diagnóstico de la colonización crónica por este microorganismo, se han reanalizado mediante curvas ROC para evaluar su capacidad diagnóstica en el seguimiento de la colonización por *P.aeruginosa*. Así mismo, se han evaluado criterios distintos a los recomendados por el manual de la técnica con la finalidad de mejorar el diagnóstico de la colonización crónica.

La utilización de técnicas moleculares puede evitar las limitaciones asociadas al cultivo convencional. La detección de ADN es simple y no se ve afectada por la viabilidad de las bacterias, la competencia por los nutrientes o la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento y permite realizar la identificación de *P.aeruginosa* directamente a partir de la muestra respiratoria. Usando cepas de referencia o aisladas previamente por cultivo, la sensibilidad (81-100%) y especificidad (85-100%) de diferentes técnicas de PCR publicadas^{91, 93-97, 100, 101} son altas. En pocos estudios se han presentado datos obtenidos directamente en muestras clínicas^{91, 98, 100, 102, 103}. En este trabajo se han puesto a punto técnicas cuantitativas de PCR en tiempo real utilizando SYBR[®] Green y curvas de disociación para identificar el DNA amplificado por la temperatura de fusión. Este tipo de técnica de PCR posee la ventaja de requerir como reactivo específico sólo la pareja de cebadores sin necesidad de utilizar sondas marcadas, lo que permitiría su utilización como técnica complementaria al cultivo sin incrementar mucho el coste.

A tal efecto, se han ensayado cuatro secuencias genéticas, publicadas previamente para la identificación de *P.aeruginosa*, pertenecientes a los genes *oprI*, *algD*, *toxA* y *gyrB*. En la reacción de PCR en tiempo real de estas 4 regiones, únicamente se han obtenido buenos resultados con las que codifican la exotoxina A (*toxA*) y la subunidad B de la DNA girasa (*gyrB*) de *P.aeruginosa*. Con ambas secuencias, se obtienen coeficientes de correlación lineal muy buenos, superiores a 0,99, para las rectas estándares preparadas a partir de cepas aisladas por cultivo. Esto permite cuantificar el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por ml de muestra con un límite de detección inferior de 10 UFC similar a los conseguidos por otros autores^{100, 102, 104, 106}. En cuanto a las características del DNA amplificado, el tamaño experimental medio para las secuencias *toxA* y *gyrB* (390 y 200pb) utilizando la técnica de PCR empleada en este estudio fue similar al teórico esperado (367 y 222 pb, respectivamente), lo que no ocurrió con las otras dos secuencias ensayadas. Con las curvas de disociación utilizadas al final de la PCR, la temperatura de fusión para el DNA amplificado obtenido con la PCR_{*gyrB*} fue de 87°C, similar a los 88°C descritos en otro trabajo en el que se utilizó la misma técnica y se recogía este dato¹⁰⁰.

En diversas publicaciones en las que se evaluaban estas dos regiones utilizando PCR convencional^{94, 97, 98, 101} o en tiempo real^{95, 100, 101, 103}, los resultados de sensibilidad y especificidad para identificar cepas de *P.aeruginosa* previamente aisladas por cultivo eran del 100% para la secuencia *gyrB*. Para la secuencia *toxA*, la sensibilidad era peor (95-98%) con una especificidad del 100%.

En las publicaciones en las que se han valorado directamente en muestras clínicas diferentes técnicas de PCR para *P.aeruginosa*, utilizando los resultados del cultivo convencional como técnica de referencia, se han hallado sensibilidades del 73 al 100% con especificidades del 67 al 95%^{91, 93, 98, 100, 104}. En una de ellas⁹⁸ se utilizaba una PCR para la secuencia *toxA* en 57 muestras, con una sensibilidad de 73% y una especificidad del 89% respecto al cultivo. En otras dos^{100, 103}, en las que se analizaron 2099 y 108 muestras respiratorias, los resultados de la PCR*gyrB* fueron mejores con sensibilidad del 94-100% y especificidad del 95-96% respecto a los resultados del cultivo.

En la puesta a punto de las técnicas de PCR para este estudio se evaluaron un total de 122 muestras de exudado faríngeo previamente analizadas por cultivo. Respecto a éste, la sensibilidad de la PCR*gyrB* para detectar *P.aeruginosa* fue del 87% con una especificidad del 95%. Para la PCR*toxA* los resultados de sensibilidad fueron peores (44%) con una especificidad similar (96%). Uno de los problemas al evaluar las técnicas de PCR en muestras clínicas son los resultados positivos de PCR con cultivo negativo que son considerados falsos positivos por ser el cultivo la técnica de referencia. Si en nuestros resultados se valoran el cultivo y las dos PCR conjuntamente y se consideran como positivas las muestras con un mínimo de dos resultados positivos, la sensibilidad de la PCR*gyrB* (94,4%) es mejor que la del cultivo (83,3%) o la de la PCR*toxA* (55,6%) con valores de especificidad similares para las tres técnicas (98,1%, 99,0% y 99,0%, respectivamente).

Una de las posibles explicaciones a los resultados de PCR positiva con cultivo negativo es la presencia residual de bacterias no viables procedentes de episodios anteriores de colonización por *P.aeruginosa* (99) o la presencia esporádica de bacterias no detectables por cultivo que son eliminadas sin llegar a colonizar (106). Por tanto, es interesante valorar si este tipo de resultados se corresponden con recuentos bajos y pueden descartarse utilizando

técnicas cuantitativas y estableciendo puntos de corte capaces de diferenciar entre pacientes no colonizados y colonizados por *P.aeruginosa*. Aunque no se han publicado estudios valorando los resultados cuantitativos de las técnicas de PCR, en el trabajo de Billard-Pomares et al¹⁰⁴, en el que se analizaron muestras de esputo mediante amplificación por PCR en tiempo real de una secuencia del gen *OprL*, la media del número de UFC por ml de esputo en el grupo de pacientes no colonizados era claramente inferior (28, 16-79) a la del grupo de pacientes colonizados (790, 63-1540). En el presente trabajo las diferencias en el número de UFC por ml fueron estadísticamente significativas, tanto utilizando la PCR cuantitativa para la secuencia *gyrB* ($p < 0,001$) como para la secuencia *toxA* ($p < 0,01$) entre los pacientes no colonizados y colonizados.

El análisis de los resultados cuantitativos de las dos técnicas de PCR, en las muestras de pacientes estables microbiológicamente, confirma los mejores resultados de la PCR_{*gyrB*} para diferenciar entre pacientes colonizados y no colonizados. La PCR_{*gyrB*} cuantitativa alcanza una clasificación de técnica muy buena con un área bajo la curva de 0,919 (IC95% 0,854-0,984) y el mejor punto de corte es ≥ 35 UFC / ml. Para el diagnóstico de colonización por *P.aeruginosa*, sensibilidad (86,0%), VPN (92,2%) y exactitud (93,1%) son mucho mejores con respecto al cultivo de la misma muestra (44,2%, 75,3% y 79,3%). Especificidad (97,3%) y VPP (94,9%) también son muy buenos y cercanos al 100% del cultivo.

Los mejores resultados se han obtenido por tanto con la PCR_{*gyrB*} cuando se valora como positiva por encima de 35 UFC por ml de muestra. Aunque de esta forma se mejora la especificidad sin pérdida de sensibilidad, la utilización de una segunda técnica de PCR permitiría confirmar los resultados obtenidos por la técnica PCR_{*gyrB*} cuando el cultivo fuese negativo. En nuestro caso, y a pesar de la peor sensibilidad de la PCR_{*toxA*}, en muestras con PCR_{*gyrB*} positiva pero cultivo negativo, la utilización de la PCR_{*toxA*} con un punto de corte ≥ 20 UFC / ml permite confirmar la detección de *P.aeruginosa* en el 50% de ellas.

También se ha analizado la utilidad, para identificar a los pacientes colonizados por *P.aeruginosa*, de la determinación del título de anticuerpos frente a tres antígenos de *P.aeruginosa*, proteasa alcalina (PA), elastasa (ELA), y exotoxina A (ETA). Estos tres productos extracelulares purificados han sido los más utilizados simultáneamente como

antígenos en las técnicas serológicas. Se han encontrado niveles de anticuerpos significativamente más elevados en pacientes con colonización crónica por *P.aeruginosa* en comparación con pacientes con colonización intermitente o no colonizados y los pacientes portadores de cepas mucoides muestran títulos más elevados que los colonizados por cepas no mucoides⁶³. Estos antígenos purificados tienen la ventaja de ser más fáciles de normalizar y además se ha comercializado un equipo (Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG EIA de Mediagnost, Alemania) que permite la detección de anticuerpos de forma diferenciada frente a cada uno de ellos con la consiguiente ventaja en cuanto a la estandarización y el control de calidad necesarios en el ámbito asistencial.

Este equipo comercial o técnicas similares de preparación propia se han evaluado en pacientes con FQ en algunas publicaciones⁸⁴⁻⁸⁷ y se ha intentado establecer puntos de corte, distintos a los utilizados para el diagnóstico de la infección crónica, para la detección precoz de la colonización por *P.aeruginosa* con la finalidad de mejorar el diagnóstico en pacientes incapaces de expectorar. En estos trabajos la sensibilidad para identificar aislamiento de *P.aeruginosa* es muy variable para los diferentes antígenos individualmente (del 33 al 85%) aunque con buena especificidad (del 89-100%). Las divergencias en los resultados son atribuibles no solo a la utilización de diferentes puntos de corte para definir los resultados positivos sino también a diferencias en los criterios para definir los grupos de pacientes según el estadio de colonización pulmonar por *P.aeruginosa*. Algunos autores utilizan el criterio más clásico que valora los resultados de los cultivos en un periodo de 6 meses previos a la muestra utilizada en la serología, mientras que otros utilizan un periodo de 12 meses o tienen en cuenta todos los cultivos durante periodos más largos de hasta 3 años.

En este trabajo, en el estudio para seleccionar los mejores puntos de corte se han definido los grupos de pacientes teniendo en cuenta no solo la colonización en los 12 meses previos a la toma de la muestra sino también la colonización en los 12 meses posteriores y de esta forma se ha intentado controlar el impacto tanto de la colonización previa como posterior en los resultados de las técnicas evaluadas. Los mejores resultados individuales, para diferenciar entre pacientes colonizados y no colonizados, se han obtenido con la determinación de anticuerpos anti-ELA con una área bajo la curva más elevada (0,842, IC

95% 0,764-0,919) y una valoración como test bueno. Las áreas bajo la curva para las determinaciones de anticuerpos anti-PA (0,829, 0,748-0,910) y anti-ETA (0,818, 0,731-0,904) son algo menores pero alcanzan también una valoración de test bueno para ambas pruebas. En el trabajo de Tramper et al⁸⁶, donde también se utilizan curvas ROC, el antígeno ELA (0.926, 0.882-0.969) también obtiene los mejores resultados seguido del antígeno PA (0.909, 0.856-0.963) y ETA (0.874,0.821-0.927).

Tramper et al⁸⁶ utilizan como puntos de corte para el aislamiento de *P.aeruginosa* títulos muy bajos, cualquier resultado positivo para ELA y PA y superior al título 1/35 para ETA. Otros autores^{85,87} proponen puntos de corte más elevados y distintos para cada uno de los antígenos, (ETA >1/1000, PA >1/285 y ELA >1/300). Los resultados del presente estudio coinciden con estos dos últimos y los mejores resultados también se obtienen con puntos de corte a títulos más bajos para los anticuerpos anti-ELA (1/240) y anti-PA (1/180) y un título más elevado para los anticuerpos anti-ETA (1/800).

En el trabajo de Kappler et al⁸⁴ se utiliza para los tres antígenos el título 1/500, que el manual de la técnica contempla como dudoso para el diagnóstico de la colonización crónica y que estos autores proponen para diferenciar entre pacientes con o sin aislamiento por *P.aeruginosa*. En nuestro estudio, los puntos de corte calculados mediante curvas ROC se comportan mejor que el punto de corte 1/500 tanto individualmente como combinando los resultados de los tres antígenos.

En general^{84, 85, 87}, las pruebas de detección de anticuerpos discriminan mejor entre pacientes con o sin aislamiento de *P.aeruginosa* cuando se valoran los resultados de los tres antígenos conjuntamente. Cuando se considera positiva la presencia de anticuerpos frente al menos uno de los tres antígenos mejora la sensibilidad (69-93%) aunque con un ligero descenso de la especificidad (93-96%) con respecto a los resultados individuales de los tres antígenos. Los mejores resultados los obtienen Ratjen et al⁸⁵ con una sensibilidad y especificidad del 93%. En su trabajo el porcentaje de pacientes con colonización intermitente es muy bajo (3%) e inferior a la proporción (15-27%) de este grupo de pacientes en otros trabajos, incluido el nuestro (22%). Esto podría explicar sus mejores resultados ya que los

pacientes con colonización intermitente son los que con mayor probabilidad pueden tener resultados ambiguos.

Cuando en el presente trabajo, se utilizan los puntos de corte calculados mediante curvas ROC, se combinan los resultados de los tres antígenos y se utiliza como criterio de positividad para la colonización por *P.aeruginosa* la presencia de anticuerpos frente al menos uno de los tres antígenos, también mejoran los resultados con respecto a los antígenos individuales. La sensibilidad (86,0%), VPN (90,8%) y exactitud (82,4%) son también mejores que los resultados del cultivo (44,2%, 75,3% y 79,3%), pero empeoran especificidad (80,8%) y VPP (72,5%). Alguno de estos parámetros mejora si se utiliza como criterio de positividad la presencia de anticuerpos frente al menos dos de los antígenos. En este caso mejoran especificidad (90,4%), VPP (82,1%). y exactitud (84,5%) pero la sensibilidad (74,4%) y VPN (85,7%) descienden aunque continúan siendo mejores que los del cultivo y mejores que los obtenidos con los antígenos individualmente. En el presente trabajo, globalmente los resultados de las técnicas de detección de anticuerpos tanto individualmente como combinadas son peores que los resultados de la PCR_{gyrB} para distinguir entre pacientes colonizados y no colonizados.

En el único trabajo en el que se valoraron conjuntamente los resultados de cultivo, serología y PCR⁸⁷ también son mejores los resultados de ésta última, en este caso una técnica convencional de PCR a tiempo final para la secuencia *algD* que codifica la GDP manosa deshidrogenasa de *P.aeruginosa*. La técnica de PCR detecta un mayor número de pacientes con *P.aeruginosa* (61%) que el cultivo (48%) o la serología (44%) individualmente. Así mismo, los autores valoran las distintas combinaciones de técnicas y los mejores resultados se obtienen con la combinación de cultivo y PCR (65%) o con la combinación de PCR y serología (70%) o de cultivo, PCR y serología (70%). Estos autores concluyen que la técnica de PCR, o de cualquier combinación que la incluya, es capaz de identificar un mayor número de pacientes con *P.aeruginosa* y que estas diferencias son estadísticamente significativas respecto al cultivo, la serología o la combinación de ambas.

En nuestro caso, cuando a la PCR_{gyrB} \geq 35 UFC/ml se le añaden las técnicas serológicas, la sensibilidad y VPN para identificar la colonización por *P.aeruginosa* mejoran,

tanto para la combinación con la detección de anticuerpos anti ELA $\geq 1/240$ (93,0% y 95,5%, respectivamente) como cuando se combina PCR $gyrB$ con la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos de *P.aeruginosa* (95,3% y 96,7%, respectivamente). Sin embargo, los resultados de especificidad, VPP y exactitud son peores que los obtenidos con la PCR $gyrB$ sola o combinada con el cultivo.

El diagnóstico de la colonización crónica por *P.aeruginosa* no suele presentar problemas en la mayoría de pacientes capaces de expectorar y en los que el control microbiológico se apoya básicamente en el cultivo de esputo. Sin embargo, en los pacientes de corta edad incapaces de expectorar, el control microbiológico se realiza mediante cultivo de exudado faríngeo con el consiguiente peligro de menor sensibilidad y retraso en el diagnóstico. En el presente estudio, en pacientes estables microbiológicamente el control microbiológico habitual se había realizado principalmente mediante cultivo de esputo en el 70,6% de los pacientes con colonización crónica. Por el contrario, en el 50% de los pacientes con colonización intermitente, en el 50% de los pacientes no colonizados pero con antecedentes de colonización intermitente o crónica y en más del 80% de los pacientes no colonizados, tanto los nunca colonizados como los que tenían antecedentes de colonización inicial, el seguimiento se había realizado principalmente mediante cultivo de exudado faríngeo. De igual modo, en los 68 pacientes del estudio con 24 meses de seguimiento analizado, el control microbiológico convencional también se había realizado principalmente a partir de cultivo de exudado faríngeo en el 72% de ellos.

Como ya se ha comentado, un cultivo aislado de exudado faríngeo tiene baja sensibilidad para identificar la colonización por *P.aeruginosa*^{54, 55, 57-59}. En nuestro estudio en pacientes estables microbiológicamente, la sensibilidad (67,4%) y el VPP (57,9%) del cultivo también son muy bajos para identificar colonización crónica por *P.aeruginosa* con los resultados de una sola muestra de exudado faríngeo. Por tanto es deseable, principalmente en los pacientes que ya han sufrido algún episodio de colonización previa por *P.aeruginosa*, utilizar técnicas más sensibles para poder diagnosticar y tratar precozmente la colonización crónica⁵⁷. Para evaluar la capacidad de la PCR para identificar pacientes con colonización crónica, se han analizado los resultados cuantitativos de las técnicas de PCR $gyrB$ y PCR $toxA$

y se han comparado con los resultados del cultivo y del título de anticuerpos frente a los tres antígenos de *P.aeruginosa*, PA, ELA y ETA.

Para diferenciar entre pacientes con y sin colonización crónica, también son mejores los resultados de la PCR_{gyrB} con un área bajo la curva más elevada (0.955, IC95% 0,919-0,991) que para la PCR_{toxA} (0,921, 0,846-0,996), y una valoración para ambas de prueba muy buena. Las diferencias en la mediana del número de UFC por ml entre pacientes con colonización intermitente (155/24-1166) y crónica (13276/3372-79316) son estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en el caso de la PCR_{gyrB}. Para la PCR_{toxA}, los resultados son peores pero también las diferencias entre ambos grupos de pacientes (12/0-854 y 3800/565-49050) son estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

Para la PCR_{gyrB} el punto de corte con los mejores resultados para identificar pacientes con colonización crónica es igual o superior a 5000 UFC por ml. Aunque los valores de sensibilidad (76,5%) y VPP (72,2%) son superiores a los del cultivo, continúan siendo bajos. Para la PCR_{toxA}, el punto de corte seleccionado es de 1500 UFC por ml, pero también los resultados son peores comparados con la PCR_{gyrB}. Aunque existen trabajos publicados con técnicas de PCR en tiempo real con las que sería posible obtener resultados cuantitativos, en ninguno de ellos se ha evaluado su utilidad en el diagnóstico de la colonización crónica por *P.aeruginosa* por lo que ha sido imposible comparar los resultados de este trabajo.

Para estudiar su utilidad como técnica complementaria al cultivo para identificar pacientes con colonización crónica, los resultados de PCR se han valorado teniendo en cuenta el resultado del cultivo. En los pacientes con un resultado de cultivo negativo, los resultados superiores al correspondiente punto de corte de las dos técnicas de PCR, tanto individualmente como combinadas, se correlacionan estadísticamente con el diagnóstico de colonización crónica ($p < 0,001$). Por el contrario, en pacientes con un resultado positivo de cultivo los resultados son peores y para las dos PCR, solas o en combinación, la relación con el diagnóstico de colonización crónica por *P.aeruginosa* no es estadísticamente significativa. Por tanto la utilidad de estas técnicas de PCR cuantitativa en el diagnóstico de la

colonización crónica es reducida y solo tendrían utilidad en el caso de pacientes con resultados de cultivo negativo.

La finalidad inicial de las pruebas serológicas en el contexto de la fibrosis quística es identificar a los pacientes con colonización crónica. Los criterios del manual de la técnica comercial que se había utilizado en los pacientes del estudio para determinar el título de anticuerpos frente a los tres antígenos de *P.aeruginosa* (PA, ELA y ETA) considera como positivos los títulos a partir de 1/1250 y dudosos a partir de 1/500. Recomienda combinar los resultados del título de anticuerpos frente a los tres antígenos y utilizar como criterio de positividad para la colonización crónica por *P.aeruginosa* la presencia de anticuerpos frente al menos uno de los antígenos.

Utilizando la misma técnica comercial y los criterios recomendados por el manual de la técnica, Tramper et al⁸⁶ analizaron 220 pacientes con FQ (42% no colonizados, 27% colonización intermitente, 31% crónica). Para definir el estatus de colonización de los pacientes estos autores utilizaron el periodo de tres años previos a la obtención de la muestra de suero y los criterios de Lee que definen la colonización crónica cuando más del 50% de los cultivos son positivos. Cuando se utiliza el punto de corte 1/1250, la sensibilidad para la colonización crónica es del 66% con una especificidad del 96%. Utilizando el título 1/500, la sensibilidad aumenta (79%) con descenso de la especificidad (89%). En el trabajo de Kappler et al⁸⁴, se analizaron 183 pacientes (37% no colonizados, 15% colonización intermitente y 48% crónica) utilizando también la misma técnica comercial y el título 1/500 como punto de corte. El estatus de colonización se basó en el periodo de dos años previo y se consideraron positivos los pacientes con un mínimo de 7 muestras positivas del total de 8 analizadas. La sensibilidad para diagnóstico de la colonización crónica fue del 98% con una especificidad del 83%.

En nuestro trabajo, se han analizado 116 pacientes (63% no colonizados, 22% colonización intermitente y 15% crónica) también con la misma técnica comercial. Para definir el estatus de colonización se ha tenido en cuenta tanto los 12 meses previos como los 12 posteriores a la obtención de la muestra de cada paciente incluida en el estudio. Para el punto de corte 1/1250 se obtuvo una sensibilidad del 88% y especificidad del 87%. Si se

utiliza el punto de corte 1/500, la sensibilidad alcanza el 100% pero la especificidad es del 69%.

Si se valoran los resultados obtenidos con el punto de corte 1/500 utilizado en los tres trabajos, los resultados del presente estudio coinciden con los de Kappler et al⁸⁴ ya que en ambos la sensibilidad de este punto de corte es máxima (100 y 98%, respectivamente) con un valor de especificidad más bajo, aunque muy diferente entre el presente trabajo (69%) y el de Kappler et al⁸⁴ (83%). Por el contrario, los resultados obtenidos por Tramper et al⁸⁶ son sorprendentes por la baja sensibilidad de ambos puntos de corte con una especificidad elevada en contradicción con los resultados de otros trabajos que, aunque utilicen antígenos o puntos de corte distintos, en general encuentran una buena sensibilidad para el diagnóstico de la infección crónica^{108, 109} con distintas técnicas de detección de anticuerpos. Una posible explicación sería el criterio utilizado para la clasificación de los pacientes que al basarse en un periodo prolongado de tiempo, 3 años; previo a la obtención de la muestra de suero analizada puede favorecer la inclusión en el grupo de colonización crónica de pacientes con colonización intermitente con títulos bajos de anticuerpos. Por el contrario los criterios utilizados por Kappler et al⁸⁴ o por nosotros, más exigentes, es menos probable que incluyan en la categoría de colonización crónica, pacientes que en realidad son intermitentes. En todo caso, estas discrepancias explican la dificultad para valorar la serología de *P.aeruginosa* en el contexto de la FQ y la necesidad de evaluar sus resultados en cada entorno concreto puesto que la interpretación de los resultados estará muy influenciada por características, como la edad de los pacientes, la proporción de muestras de esputo o exudado faríngeo analizadas en el control microbiológico habitual o por los criterios utilizados para definir el estatus de colonización.

En el presente trabajo se obtienen mejores resultados utilizando el punto de corte 1/1250 que con el punto de corte 1/500. Con este último la sensibilidad y el VPN son del 100% y por tanto sería muy útil para descartar la colonización crónica; sin embargo, la especificidad es baja. Con el punto de corte 1/1250, sensibilidad (88,2%) y VPN (97,7%) son superiores a los obtenidos con el cultivo o la PCRgyrB, con buena especificidad (86,9%) pero con un VPP bajo (53,6%). Este indicador mide la probabilidad de que un paciente con

un resultado positivo esté colonizado crónicamente y depende de la prevalencia. En nuestro estudio, la prevalencia de pacientes con colonización crónica es baja (14,7%) e inferior a la mayoría de estudios de este tipo^{84, 86, 108} que incluyen pacientes de todas las edades mientras que en nuestro trabajo sólo se han incluido pacientes pediátricos en los que a nuestro juicio tiene mayor interés la utilización de este tipo de técnicas. En un estudio¹⁰⁹ realizado en dos grupos de pacientes menores de 7 años analizados mediante cultivo de lavado broncoalveolar (LBA) y detección de anticuerpos anti-ETA, el VPP de esta última técnica también fue baja (11-19%) con sensibilidad (84-90%) y VPN (92-98%) altos, lo que apoyaría la utilización de la serología como técnica de cribado para seleccionar los pacientes que podrían beneficiarse de la realización de técnicas invasivas como el LBA o un control microbiológico más estrecho.

Para mejorar nuestros resultados en el diagnóstico de la colonización crónica, se han reanalizado mediante curvas ROC los títulos de anticuerpos frente a los tres antígenos de *P.aeruginosa*. El título de anticuerpos discrimina bien entre pacientes con o sin colonización crónica, con áreas bajo la curva más elevadas para la determinación de anticuerpos anti-ETA (0,935, IC95% 0,875-0,996) y anti-ELA (0,933, 0,882-0,984) y una valoración de ambas pruebas como test muy bueno. Para la determinación de anticuerpos anti-PA es menor (0,917, 0,858-0,975), pero también alcanza la valoración de test muy bueno. Las diferencias en la mediana del título de anticuerpos entre pacientes no colonizados, con colonización intermitente o crónica para ETA (<1/200, 1/480 y 1/2700, respectivamente), ELA (<1/100, 1/258 y 1/1825) y PA (<1/100, 1/205 y 1/780) son estadísticamente significativas ($p < 0,001$) para todos los antígenos.

En un estudio de Pressler et al¹⁰⁸ en el que se evaluaron diferentes técnicas serológicas (CIE y ELISA) y antígenos (antígeno soluble y Exotoxina A) encontraron resultados similares, Al no presentar los resultados en forma de títulos de anticuerpos sino en unidades arbitrarias de ELISA no es posible comparar sus resultados cuantitativos con los del presente trabajo. En el estudio de Pressler et al¹⁰⁸, la diferencias en el nivel de anticuerpos también alcanzan significación estadística ($p < 0,05$) para las técnicas de ELISA y los antígenos soluble y ETA entre los grupos de pacientes no colonizados (0,44 y 0,32 UE,

respectivamente), colonizados intermitentemente (0,74 y 0,66 UE) y crónicos (35,2 y 3,02 UE). Estos autores concluyen que la determinación del nivel de anticuerpos anti-*P.aeruginosa* permitiría complementar la información proporcionada por el control microbiológico convencional y facilitaría una mejor clasificación de los pacientes según su estadio de colonización.

En este trabajo, el punto de corte seleccionado para los antígenos ETA y PA ha sido el título 1/1900, mientras que para el antígeno ELA ha sido 1/1500. Los puntos de corte que se han seleccionado mediante curvas ROC son más elevados que los propuestos por el manual de la técnica, lo cual es lógico puesto que de esa manera mejoran la especificidad y el VPP. Los mejores resultados individuales se obtienen con el antígeno ETA con una sensibilidad del 64,7%, VPP del 78,6% y especificidad, VPN y exactitud superiores al 90%. Cuando se combinan los resultados del título de anticuerpos frente a los tres antígenos utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROC ($PA \geq 1/1900$ y/o $ELA \geq 1/1500$ y/o $ETA \geq 1/1900$), la sensibilidad aumenta (88,2%) con respecto a los antígenos individuales. Aunque la sensibilidad es la misma respecto a los resultados combinados cuando se utiliza el punto de corte 1/1250, la especificidad (91,9%), VPP (65,2%) y exactitud (91,4%) son mejores.

Para investigar su utilidad para identificar pacientes con colonización crónica como técnica complementaria al cultivo, los resultados de la detección de anticuerpos se han valorado teniendo en cuenta el resultado del cultivo. Para la detección de anticuerpos anti ETA existe relación estadísticamente significativa entre la presencia de títulos iguales o superiores a 1/1900 y el diagnóstico de colonización crónica tanto en los pacientes con un resultado de cultivo negativo ($p < 0,001$) como positivo ($p < 0,05$). Lo mismo ocurre cuando se combinan los resultados de la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos y se utilizan los puntos de corte calculados mediante curvas ROC ($PA \geq 1900$ y/o $ELA \geq 1500$ y/o $ETA \geq 1900$). Esta relación es estadísticamente significativa para la presencia de anticuerpos frente al menos uno de los antígenos tanto en pacientes con cultivo positivo ($p < 0,05$) como negativo ($p < 0,001$).

Por el contrario, cuando se combinan los resultados de la detección de anticuerpos utilizando el punto de corte 1/1250, la relación con el diagnóstico de colonización crónica no es estadísticamente significativa cuando el resultado del cultivo es positivo. Y como ya se ha comentado antes, tampoco lo son los resultados de la PCR $gyrB$ superiores a 5000 UFC/ml.

Por tanto, los mejores resultados para identificar colonización crónica por *P.aeruginosa*, se obtienen con las técnicas de detección de anticuerpos, independientemente del resultado del cultivo. La realización periódica de estas técnicas, sobre todo en pacientes con colonización intermitente y seguimiento microbiológico mediante cultivo de exudado faríngeo, permitiría identificar un mayor número de pacientes con colonización crónica con un VPP mucho mayor que el cultivo. Los mejores resultados se obtienen combinando la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos de *P.aeruginosa* y utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROC.

En 68 pacientes, divididos en dos grupos según se hubiera o no aislado *P.aeruginosa*, se pudo realizar un análisis de los resultados de cultivo, PCR y serología correspondientes a un periodo de 24 meses. La media de muestras procesadas por cultivo en el control microbiológico habitual fue de 14 y 12 para cada uno de los grupos durante los 24 meses de seguimiento analizado, lo que representa una muestra cada dos meses y por tanto un control correcto. Por otra parte, en el 90% de los pacientes se pudieron valorar los resultados obtenidos con un mínimo de 6 muestras de suero y exudado faríngeo durante el periodo de 24 meses analizado, lo que representa una media de 3 a 4 muestras anuales analizadas simultáneamente por cultivo, PCR y serología.

En el control microbiológico de los 68 pacientes, el microorganismo aislado con mayor frecuencia fue *S.aureus* en el 83,8% de los pacientes. La colonización por *P.aeruginosa* fue del 51,5% si bien en el grupo de 35 pacientes colonizados el 42,9% tuvieron un único aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses. Estos resultados son similares a otras series. Así en el seguimiento durante 5 años de un grupo de 81 pacientes en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid ¹⁹, se observó también una mayor incidencia de *S.aureus*, 90%, en la franja de edad de 0 a 10 años y 80% en la de 11 a 20 años. Respecto a *P.aeruginosa*, la colonización es menos frecuente en esas franjas de edad y se situaría algo

por debajo del 60% de 0-10 años y ligeramente por encima entre los 11 y los 20 años. Respecto a los datos del registro estadounidense de pacientes con FQ (13), la incidencia de *S.aureus* sería algo menor que la encontrada en el presente trabajo y estaría situada en el 75%, entre los 6 y los 17 años mientras que para *P.aeruginosa* se situaría entre el 30% en la franja de edad de 6-10 años y el 50% entre los 11 y los 17 años. Estos resultados son perfectamente superponibles a los nuestros y permitirían asumir que, a pesar del modesto número de pacientes analizados, los resultados serían extrapolables a la población de pacientes con FQ de igual franja de edad.

El análisis de los resultados de los 68 pacientes durante el periodo 24 meses de seguimiento analizado ha permitido confirmar los buenos resultados de la PCR $_{gyrB}$ en el diagnóstico de la colonización por *P.aeruginosa*. La diferencia en el valor promedio de la PCR $_{gyrB}$ entre los pacientes sin aislamiento (4 UFC, 0-14) y con aislamiento de *P.aeruginosa* (250 UFC, 48-5055) es estadísticamente significativa ($p < 0,001$). La sensibilidad (91,4%) de la PCR $_{gyrB}$, cuando se consideran positivos los pacientes con un valor promedio superior a 35UFC durante el periodo de seguimiento, es muy superior a la que se obtiene con los resultados del cultivo de las mismas muestras (68,6%). Esta mayor sensibilidad de la PCR $_{gyrB}$ es especialmente interesante entre los pacientes con un único cultivo positivo a *P.aeruginosa* durante el periodo de 24 meses. En este grupo de pacientes la sensibilidad de la PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC/ml es mucho mayor (86,7%) que la del cultivo (46,7%), mientras que en el grupo de pacientes con dos o más cultivos positivos, la diferencia no es tan pronunciada cuando se comparan PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC/ml (95,0%) y cultivo (85,0%). Para la PCR $_{gyrB}$ la especificidad (84,8%) y el VPP (86,5%) son menores al 100% del cultivo, pero el VPN es alto (90,3%) y muy superior al del cultivo (75,0%).

Cuando se combinan los resultados de cultivo y PCR $_{gyrB} \geq 35$ UFC/ml, la sensibilidad (93,9%) para identificar pacientes colonizados durante los 24 meses de seguimiento analizado es muy superior a la del cultivo aislado (68,6%). También aumenta el VPN (93,3%) y exactitud (89,4%) aunque la especificidad (84,8%) y el VPP (86,1%) continúan siendo menores que para el cultivo (100%).

Cuando a la combinación de cultivo y PCR $gyrB$ se añaden los resultados de la detección de anticuerpos anti-ELA mejoran ligeramente sensibilidad (97,1%) y VPN (96,3%). Sin embargo, la especificidad (78,8%) y el VPP (82,9%) son peores. Cuando se combinan cultivo, PCR $gyrB$ \geq 35 UFC/ml y los resultados de las tres técnicas de detección de anticuerpos utilizando los puntos de corte individuales PA \geq 1/180, ELA \geq 1/240 y ETA \geq 1/800 los resultados no son mejores. La sensibilidad es igual a la que se consigue con la combinación de cultivo, PCR $gyrB$ y anticuerpos anti-ELA pero con especificidad mucho peor (63,6%). Por tanto, también se confirma con los resultados del seguimiento que la aportación de la serología en el diagnóstico de la colonización por *P.aeruginosa* es limitada y son mejores los resultados obtenidos complementando el cultivo con técnicas moleculares para detectar el DNA de la bacteria.

En el presente trabajo, de 5 pacientes con un valor promedio de la PCR $gyrB$ \geq 35 UFC/ml pero sin aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado, en 4 (80%) se aisló *P.aeruginosa* por cultivo en los 12 meses siguientes a la última muestra del seguimiento analizada (entre 1 y 7 meses después). Uno de los pacientes había recibido azitromicina y 3 tratamiento específico frente a *P.aeruginosa* y en los 5 pacientes el título de anticuerpos era negativo frente a los tres antígenos. El valor pronóstico de las técnicas de PCR se ha valorado en algunos estudios con seguimiento de pacientes mediante cultivo y PCR. En el estudio de Xu et al⁹⁸ en 10 pacientes con resultado positivo de PCR y cultivo negativo, se aisló *P.aeruginosa* posteriormente (entre 4 y 17 meses después) en 5 (50%) de ellos. En el estudio de Deschaght et al¹⁰², de 23 pacientes con resultados de PCR positiva y cultivo negativo en los que al menos se obtuvo una muestra posteriormente, en cinco se aisló *P.aeruginosa*. En el estudio más extenso de Logan¹⁰³, en el que se realizaron dos PCR para las secuencias algD y *gyrB*, en el 32% de las muestras con resultados discordante se aisló *P.aeruginosa* en una muestra posterior. En el estudio de McCulloch¹⁰⁶, en 38 muestras con resultados discordantes con PCR positiva, 24 eran hallazgos esporádicos mientras que 14 (37%) eran resultados positivos repetidos. Todos los trabajos coinciden en una mayor sensibilidad de las técnicas de PCR, que aumentan el número de pacientes con resultados positivos de *P.aeruginosa*, confirmados por el uso de más de una técnica de PCR en uno de los trabajos⁹⁸ o por la identificación por secuenciación de los resultados

discordantes en otro¹⁰⁶. El hecho de que un porcentaje variable de los resultados no se confirmen en muestras posteriores indicaría que probablemente se trata de colonizaciones verdaderas pero transitorias que solo son detectables mediante técnicas moleculares, más sensibles que el cultivo. Es por tanto importante identificar cuáles de estos resultados positivos se asocian a colonización. En estos trabajos, los resultados de las técnicas de PCR se valoran cualitativamente, es decir como positivas o negativas. Por el contrario en el presente trabajo se han valorado los resultados cuantitativamente y al tener en cuenta el valor promedio del periodo analizado hemos descartado los resultados positivos únicos y con recuentos bajos que podrían deberse a colonizaciones transitorias por lo que nuestra correlación entre resultados de PCR $gyrB$ positivos y aislamiento de *P.aeruginosa* durante el seguimiento de 24 meses es buena. A nuestro juicio, la utilización como complemento al cultivo convencional de técnicas de PCR cuantitativas permitiría valorar el nivel de positividad. En el caso de resultados de cultivo negativo con PCR positiva, sobre todo con recuentos altos, debería sospecharse una posible colonización por *P.aeruginosa* y repetir el cultivo o realizarlo a partir de muestras más representativas de vías bajas, como el LBA. Esto mejoraría la sensibilidad en el diagnóstico de la colonización por *P.aeruginosa* sobre todo en niños pequeños incapaces de expectorar y en los que por tanto el control microbiológico mediante cultivo de exudado faríngeo tiene una sensibilidad baja.

También se ha valorado si las diferentes técnicas, individualmente o combinadas entre sí, son capaces de detectar la colonización por *P.aeruginosa* más precozmente que el aislamiento por cultivo. En el control microbiológico realizado durante los 24 meses de seguimiento analizado, la media de tiempo hasta el primer resultado positivo por cultivo fue de 9,3 meses, mientras que para la PCR $gyrB$ la media fue de 4,9 meses y para los anticuerpos anti-ELA de 6,0 meses. Las diferencias respecto a los resultados del control microbiológico habitual fueron significativas para la PCR $gyrB$ ($p < 0.001$) y para la detección de anticuerpos anti ELA ($p > 0,05$) pero no fueron significativas para ninguna de las otras técnicas de forma individual. Las diferencias con los resultados del control microbiológico habitual son estadísticamente significativas para la combinación de PCR $gyrB$ y anticuerpos anti-ELA ($p < 0,001$) y para la combinación de PCR $gyrB$ con los resultados de la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos ($p < 0,001$). Sin embargo, las diferencias en la media de

tiempo hasta el primer resultado positivo no son significativas cuando se comparan los resultados de la PCR $gyrB$ aislada o combinada con las técnicas serológicas. Por tanto complementar el cultivo con la PCR $gyrB$ acorta el tiempo hasta el primer resultado positivo hasta una media de 4,9 meses. Sin embargo, complementar la técnica de PCR $gyrB$ con los resultados de las técnicas serológicas no disminuye de forma estadísticamente significativa el tiempo hasta el primer resultado positivo con respecto a los resultados obtenidos con la PCR $gyrB$ aislada. Anecdóticamente, Xu et al⁹⁸, encuentran también, aunque solo en 5 pacientes, que las técnicas moleculares se avanzan al aislamiento por cultivo una media de 4,5 meses.

En el análisis de resultados de 68 pacientes con 24 meses de seguimiento analizado, la sensibilidad de la PCR $toxA$ también fue menor a la de la PCR $gyrB$. Sin embargo, permitiría confirmar los resultados de la PCR $gyrB$ en 24 (65%) de los 37 pacientes con resultados de PCR $gyrB$ positiva, 4 pacientes (80%) de los 5 sin aislamiento de *P.aeruginosa* y en 20 pacientes (62,5%) de los 32 con aislamiento durante los 24 meses de seguimiento. Xu et al⁹⁸ en un estudio con 57 pacientes adultos comparan el cultivo de esputo con dos técnicas de PCR convencional para las secuencias *oprL* y *toxA*. También aquí la PCR para la secuencia *toxA* tiene menor sensibilidad pero también confirma los resultados de la PCR para la secuencia *oprL* en 22 pacientes (69%) con cultivo positivo y en 3 (11%) de los pacientes con cultivo negativo. En nuestro caso sería conveniente seleccionar y poner a punto otra secuencia con sensibilidad y especificidad comparables a la PCR $gyrB$ ya que la amplificación de más de una secuencia facilitaría la valoración de los resultados de la PCR $gyrB$ cuando el resultado del cultivo es negativo. Ambas amplificaciones se podrían realizar en una misma reacción de PCR en tiempo real utilizando sondas específicas marcadas para cada una de las secuencias. Así mismo, la utilización de técnicas multiplex de PCR en tiempo real que incluyeran control interno de amplificación¹⁰² permitiría descartar falsos negativos de las técnicas de PCR por inhibición de la reacción de PCR, especialmente importante en muestras de esputo. De igual modo, la detección simultánea de DNA humano, por ejemplo amplificando el gen de la β -actina, permitiría realizar un control de calidad de las muestras¹⁰³. Esto permitirá eliminar resultados de PCR negativos que pudieran ser debidos a una pobre calidad de la muestra, especialmente en exudados faríngeos.

Durante el periodo de 24 meses de seguimiento analizado, únicamente dos pacientes cumplían criterios de colonización crónica por *P.aeruginosa* según los resultados del seguimiento microbiológico habitual, lo que representa una prevalencia del 2,9%. Este bajo número de pacientes con colonización crónica no ha permitido un análisis estadístico de los resultados por lo que se han analizado individualmente. Ninguno de los dos pacientes cumplía criterios de positividad para colonización crónica con las técnicas de detección de anticuerpos. En uno de los pacientes, los resultados tanto de la PCR_{gyrB} como de la detección de anticuerpos cumplían criterios de colonización intermitente pero no crónica y el paciente no presentó ningún aislamiento de *P.aeruginosa* al menos durante los dos años posteriores a la última muestra del seguimiento analizado. En el otro paciente, el promedio de la PCR_{gyrB} fue positivo a recuentos superiores a 5000 UFC/ml pero no tenía anticuerpos frente a ninguno de los antígenos de *P.aeruginosa*. Este paciente cumplía criterios de colonización crónica por *P.aeruginosa* según los resultados del cultivo en el seguimiento microbiológico habitual tanto en los 12 meses previos a la primera muestra del seguimiento, durante los dos años de seguimiento evaluados y en el año siguiente. Sin embargo tenía una situación clínica normal y FEV1 igual o superior al 80% aunque con presencia de BQ.

Con las técnicas de detección de anticuerpos utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROC ($PA \geq 1900$ y/o $ELA \geq 1500$ y/o $ETA \geq 1900$) y como criterio de positividad la presencia de anticuerpos frente al menos uno de los tres antígenos, se identificaron 8 pacientes con infección crónica. Ninguno cumplía criterios de colonización crónica por los resultados del cultivo, dos pertenecían al grupo de pacientes sin aislamiento y seis al grupo de pacientes con aislamiento de *P.aeruginosa* durante los 24 meses de seguimiento analizado. Ninguno de ellos había estado colonizado durante el año anterior al inicio del seguimiento. De los 8 pacientes, 6 presentaron colonización por *P.aeruginosa* en los 12 meses posteriores a la última muestra del seguimiento. Todos ellos tenían un promedio del título de anticuerpos anti-ETA $\geq 1/800$ y en 5 de ellos era superior a $1/1900$. El único paciente en el que la colonización en el año posterior al final del seguimiento fue crónica, tenía el promedio del título de anticuerpos anti ETA ($1/2815$) y el recuento de UFC/ml por la PCR_{gyrB} (120000) más elevados. En los dos pacientes en los que no se aisló *P.aeruginosa* en el año siguiente a la última muestra del seguimiento analizada, el promedio del título de

anticuerpos anti ETA fue negativo. Estos resultados coinciden con los de un estudio⁸⁵ en el que se encontraron descensos significativos en el título de anticuerpos frente a ETA en los pacientes capaces de eliminar la bacteria mientras que en los que fracasan a pesar del tratamiento precoz se observó un aumento significativo en el título de anticuerpos.

En conclusión, el cultivo convencional de muestras respiratorias sigue siendo el “patrón oro” en el control de las infecciones respiratorias en pacientes con FQ ya que proporciona información de todos los patógenos potenciales y de su susceptibilidad a los antimicrobianos. A pesar de ello, la falta de sensibilidad del cultivo del exudado faríngeo en pacientes pequeños incapaces de expectorar, hace importante explorar el papel de la serología y las técnicas moleculares en el diagnóstico precoz de la colonización por *P.aeruginosa* en este grupo de pacientes.

Para identificar más precozmente la colonización por *P.aeruginosa*, los mejores resultados se obtienen con la combinación de cultivo y PCR $gyrB$ al aumentar significativamente la sensibilidad y el VPN con respecto al cultivo aislado, mantener especificidad y VPP cercanos al 100% y acortar el tiempo hasta la detección de la primera muestra positiva. La combinación de cultivo y PCR con la detección de anticuerpos anti-ELA o con la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos de *P.aeruginosa* aumenta la sensibilidad y el VPN, con descenso de especificidad y VPP, pero no acorta significativamente el tiempo hasta el primer resultado positivo respecto a los resultados de la PCR $gyrB$ sola.

Para identificar colonización crónica por *P.aeruginosa*, los mejores resultados se obtienen con la detección de anticuerpos, independientemente del resultado del cultivo. Su realización periódica, sobre todo en pacientes con colonización intermitente y seguimiento microbiológico mediante cultivo de exudado faríngeo, permite identificar pacientes con colonización crónica con sensibilidad y VPP superiores al cultivo. Los mejores resultados se obtienen con la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos de *P.aeruginosa* utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROC y considerando positivas las muestras con anticuerpos frente a un mínimo de un antígeno.

6. CONCLUSIONES

1. Para detectar *P.aeruginosa* en muestras de exudado faríngeo, la sensibilidad de la técnica cuantitativa de PCR que amplifica una secuencia del gen de la subunidad B de la DNA girasa (*gyrB*) es mucho mejor que la del cultivo o de la PCR del gen de la exotoxina A (*toxA*), con valores de especificidad similares para las tres técnicas.
2. Para diagnosticar colonización por *P.aeruginosa*, los mejores resultados se obtienen con la PCR_{*gyrB*} utilizando un punto de corte igual o superior a 35 UFC / ml. La sensibilidad y el VPN mejoran respecto al cultivo aislado, con especificidad y VPP cercanos al 100%. Los resultados para la PCR_{*toxA*}, con un punto de corte igual o superior a 20 UFC / ml son peores que para la PCR_{*gyrB*}.
3. Para diagnosticar colonización por *P.aeruginosa*, los mejores puntos de corte para la determinación de anticuerpos frente a los antígenos elastasa (ELA), proteasa alcalina (PA) y exotoxina A (ETA). son los títulos 1/240, 1/180 y 1/800, respectivamente. Los mejores resultados individuales se obtienen con la determinación de anticuerpos anti-ELA. Los resultados combinados de los tres antígenos son mejores que la determinación aislada de anticuerpos anti-ELA pero en ambos casos no se superan los resultados obtenidos con la PCR_{*gyrB*}.
4. En el seguimiento de 24 meses analizado, la media de tiempo hasta el primer resultado positivo fue menor para la PCR_{*gyrB*} (4,9 meses) que para el cultivo (9,3 meses). La diferencia es estadísticamente significativa.
5. Las diferencias en la media de tiempo hasta el primer resultado positivo cuando los resultados de la PCR_{*gyrB*} se combinan con la detección de anticuerpos anti-ELA (4,8 meses) o con la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos (3,8 meses) no son estadísticamente significativas con respecto a los resultados de la PCR_{*gyrB*} aislada.
6. Para identificar precozmente la colonización por *P.aeruginosa*, sobre todo en niños pequeños incapaces de expectorar, la combinación del cultivo y PCR_{*gyrB*} mejora la capacidad diagnóstica al aumentar significativamente sensibilidad y VPN respecto al cultivo aislado, manteniendo especificidad y VPP cercanos al 100% y acorta el tiempo hasta el primer resultado positivo. La combinación de cultivo y PCR con la

detección de anticuerpos anti-ELA o con la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos de *P.aeruginosa* aumenta sensibilidad y VPN, con descenso de especificidad y VPP, pero no acorta significativamente el tiempo hasta el primer resultado positivo respecto a la PCR $gyrB$ sola o combinada con el cultivo.

7. Para diagnosticar colonización crónica por *P.aeruginosa*, el mejor punto de corte para la PCR $gyrB$ es igual o superior a 5000 UFC / ml. Para la PCR $toxA$ es igual o superior a 1500 UFC / ml. Los resultados de la PCR $gyrB$ son mejores que los de la PCR $toxA$ o el cultivo.
8. Para diagnosticar colonización crónica por *P.aeruginosa*, los mejores puntos de corte para la determinación de anticuerpos frente a PA, ELA y ETA son los títulos 1/1900, 1/1500, 1/1900, respectivamente. Los mejores resultados individuales se obtienen con la determinación de anticuerpos anti-ETA. Los resultados mejoran cuando se combinan las técnicas individuales y son mejores que los obtenidos con las técnicas de detección de anticuerpos utilizando los criterios de interpretación recomendados por el manual de la técnica o con el cultivo aislado.
9. Cuando el resultado del cultivo es positivo únicamente los resultados de la detección de anticuerpos se asocian estadísticamente con el diagnóstico de colonización crónica por *P.aeruginosa*. Cuando el cultivo es negativo tanto los resultados de la detección de anticuerpos como los de la PCR $gyrB$ o la combinación de ambas se asocian con el diagnóstico de colonización crónica.
10. Para identificar colonización crónica por *P.aeruginosa*, los mejores resultados se obtienen combinando la detección de anticuerpos frente a los tres antígenos de *P.aeruginosa*, utilizando los puntos de corte calculados mediante curvas ROC y considerando positivas las muestras con anticuerpos frente a un mínimo de un antígeno. La realización periódica de estas técnicas, sobre todo en pacientes con colonización intermitente, permitiría identificar la colonización crónica con sensibilidad y VPP superiores al cultivo aislado.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Asensio O, Cobos N, Seculi JL, Casals T, Bosque M. Programa de cribado neonatal para la fibrosis quística en Catalunya. *Investig Clin.* 2001; 4 (supl 1):82-3.
- 2- The Clinical and Functional TRanslation of CFTR (CFTR2); disponible en <http://cfr2.org>. Copyright 2011 US CF Foundation, Johns Hopkins University, The Hospital for Sick Children.
- 3- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr.* 2008; 153(2): S4-S14.
- 4- AlonsoMJ, Heine-Suñer D, Calvo M, Rosell J, Gimenez J, Ramos MD et al. Spectrum of Mutations in the CFTR Gene in Cystic Fibrosis Patients of Spanish Ancestry *Annals of Human Genetics* 2006, 71:194–201
- 5- Maya A. Presentación pdf. Encuentros 2006, Fundación Sira Carrasco. Disponible en www.fundacionfibrosisquistica.org/DespistajeNeunatal.ppt
- 6- Welsh MJ, Smith AE: Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.*1993; 73:1251–1254
- 7- Zielenski J, Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration.*2000; 67:117–133
- 8- Rowntree RK, Harris A. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Annals of Human Genetics.*2003, 67:471–485
- 9- Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal Truncations Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis. *J Biol Chem.*1999; 274:21873–21877.
- 10- De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J et al, on behalf of the Diagnostic Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006; 61:627-35. [PubMed: 16384879]
- 11- Rosenstein BJ, Cutting GR. For the Cystic Fibrosis Consensus Panel. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr.*1998, 132: 589-595.

- 12- Koch C, Hfiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*. 1993, 341: 1065-1074.
- 13- CFF Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry. 2011 Annual Data Report. Bethesda, Maryland. © Cystic Fibrosis Foundation, 2012. Disponible en: <http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2011-Patient-Registry.pdf>
- 14- Wat D. Impact of respiratory viral infection on cystic fibrosis. *Posgrad Med J*. 2003, 79: 201-203
- 15- Olesen HV, Nielsen LP, Schiøtz PO. Viral and atypical bacterial infections in the outpatients pediatric cystic fibrosis clinic. *Pediatric Pulmonology* .2006, 41: 1197-1204
- 16- Ballesteros S, Escobar H, Villaverde R, Negredo P, Elia M, Ojeda-Vargas M et al. Microbiological parameters and clinical evolution in cystic fibrosis. En: H. Escobar, F. Baquero and L. Suarez. (eds). *Clinical ecology of Cystic Fibrosis*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1993, 55-62
- 17- Bauernfeind A, Bertele RM, Harms K, Horl G, Jungwirth R, Petermuller C et al. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection*.1987. 15:469-470
- 18- Cantón 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
- 19- Oliver A, Alarcón T, Caballero, E y Cantón R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009, 27(2):89-104.
- 20- Quinton PM. Viscosity versus composition in airway pathology (editorial and comment). *Am J Respir Crit Care Med*. 1994. 149:6-7
- 21- Lang AB, Rudeberg A, Schöni MH, Que JU, Fürer E, Schaad UB. Vaccination of cystic fibrosis patients against *Pseudomonas aeruginosa* reduces the proportion of patients infected and delays time to infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 (6):504-10

- 22- Valerius NH, Koch C, Hoiby N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet*.1991. 338:725-726
- 23- Fiel SB. Clinical management of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Lancet*.1993. 41: 1070-1074
- 24- Döring G, Conway S P, Heijerman HGM, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A et al. For the Consensus Committee: Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000, 16:749-767
- 25- Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis *Lancet* 2003; 361: 681–89
- 26- Taccetti G , Campana S, Festini F, Mascherini M, Doring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2005; 26: 458.461
- 27- Yousef AA, Jaffe A: The role of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2010, 11: 108-114.
- 28- Buyck JM, Plésiat P, Traore H, Vanderbist F, Tulkens PM, Van Bambeke F. Increased Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Macrolides and Ketolides in Eukaryotic Cell Culture Media and Biological Fluids Due to Decreased Expression of oprM and Increased Outer-Membrane Permeability. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 534-542
- 29- Bosque M, Asensio O. Severe infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. En: Alan R Hauser /Jordi Rello (eds.). *Perspectives on critical care infectious diseases series*. Boston. Hardbound:Kluwer Academic Publishers; 2003
- 30- Asensio de la Cruz O, Bosque García M Fibrosis quística. Manifestaciones respiratorias. Manejo y seguimiento. *Pediatr Integral* 2004; VIII (2):137-148
- 31- Ryan JL. Microbial factors in pathogenesis: lipopolysaccharides. 1985, p.13-25. In R. K. Root and M.A. Sande (ed.), *Septic Shock*. Churchill Livingstone, New York
- 32- Brauner A, Cryz SJ, Granstrom M, Hanson HSJ Lofstrand L, Stranviik B et al. Immunoglobulin G antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and

exotoxin A in patients with cystic fibrosis or bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993. 12(6):430-6

33- Kronborg G, Fomsgaard A, Galanos C, Freudenberg MA, Hoiby N. Antibody responses to lipid A, core, and O sugars of the *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in chronically infected cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 1992, 30:1848-1855

34- Hancock REW, Wieczorek AA, Mutharia LM and Poole K. Monoclonal antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane antigens : isolation and characterization. *Infect Immun.* 1982, 37:166-71

35- Hancock REW, Mouat EC, Speert DP. Quantitation and identification of antibodies to outer- membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* in sera of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1984; 149: 220-6

36- Mutharia LM and Hancock RE. Surface location of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F using monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 1983. 42:1027-1033

37- Aronoff SC, Stern RC. Serum IgG to outer membrane antigens of *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1988. 5:934-940

38- Morihara K. Production of elastase and proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1964;88:745-57

39- Jagger KN, Bahner DR, Warren RL. Protease phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1983; 17:55-9

40- Moss RB. Cystic fibrosis: pathogenesis, pulmonary infection, and treatment. *Clin. Infect Dis.* 1995, 21:839-851

41- Li Z, Kosorok MR, Farell PM, Laxova A, West ESH, Green CG et al. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA.* 2005, 293: 581-588

42- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168: 918–51

- 43- Hoiby N, N, Schiøtz PO. Immune complex mediated tissue damage in the lungs of cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Acta Paediatr Scand* 1982; Suppl 301: 63-73
- 44- Döring G, Albus A, Hoiby N. Immunologic aspects of cystic fibrosis. *Chest* 1988; 94: 109S–115S
- 45- Hoiby N, Koch C. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management. *Thorax*. 1990. 45:881-884.
- 46- Hoiby N, Döring G, Schiøtz PO. Pathogenic mechanisms of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Antibiot. Chemother* 1987. 39:60-76
- 47- Berger M. Inflammation in the lung in cystic fibrosis: a vicious cycle that does more harm than good?. *Clin. Rev. Allergy*. 1991. 9:119-142
- 48- Lee TW, Brownlee KG, Denton M, Littlewood JM, Conway SP. Reduction in prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection at a regional pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol* 2004; 37:104-110
- 49- Cantón R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S et al; 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(9):690-703.
- 50- Maiz L, Baranda F, Coll R, Prados C, Vendrell M, Escribano A et al. Normativa del diagnóstico y el tratamiento de la afección respiratoria en la fibrosis quística. *Arch Bronconeumol*. 2001, 37: 316-324
- 51- Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2003; 2:29–34
- 52- Alarcón T, Caballero E, Cantón R, Oliver A. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *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/documentos/index>)

53- Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Olinsky A, Phelan PD. Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:267–275

54- Jung A, Kleinau I, Schonian G, Bauernfeind A, Chen C, Griese M et al. Sequential genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* from upper and lower airways of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2002;20:1457–1463

55- Ramsey BW, Wentz KR, Smith A, Richardson M, Williams-Warren J, Hedges DL. Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:331–337

56- Rosenfeld M, Emerson J, Accurso F, Armstrong D, Castile R, Grimwood K et al. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1999;28:321–328

57- Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001; 183:444–452

58- Equi A C, Pike S E, Davies , Bush A. Use of cough swabs in a cystic fibrosis clinic. *Arch. Dis. Child.* 2001;85: 438-439.

59- Kabra SK, Alok A, Kapil A, Aggarwal G, Kabra M, Lodha R et al. *J Indian J Pediatr.* 2004; 71:21-23

60- Kahn FW, Jones JM. Diagnosing bacterial respiratory infection by bronchoalveolar lavage. *J Infect Dis* 1987; 155: 862–9

61- Henig NR, Tonelli MR, Pier MV, Burns JL, Aitken ML. Sputum induction as a research tool for sampling the airways of subjects with cystic fibrosis. *Thorax* 2001;56:306–311

- 62- Gibson RL, Burns JL, and Ramsey BW. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168: 918–951
- 63- Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TFW. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibr* 2005; 4:37–43
- 64- Koch C, Hoiby N. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67:239–47)
- 65- Hoiby N, Flensburg EW, Beck B, Friis B, Jacobsen SV, Jacobsen L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. *Scand J Respir Dis* 1977; 58:65–79
- 66- Doring G, Hoiby N. Longitudinal study of immuneresponse to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis. *Infect Immun* 1983; 42:197–201
- 67- Shand GH, Pedersen SS, Tilling RJ Brown MRW, Hoiby N. Use of immunoblot detection of serum antibodies in the diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J. Med Microbiol* 1988; 27: 169-77
- 68- Giordano A, Magni A, Filadoro F, Graziani C, Quattrucci S, Cipriani P. Study of IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in early cystic fibrosis infection. *New Microbiol* 1998; 21:375–378
- 69- Mutharia LM, Nicas TI, Hancock RE. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *J Infect Dis.* 1982. 146:166-71
- 70- Pedersen SS, Espersen F, Hoiby N. Diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1987. 10: 1830-1836
- 71- Brett MM, Ghoneim ATM, Littlewood JM. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Archives of Dis in Child.* 1986. 61:114-1120

- 72- Pressler T, Frederiksen B, Skov M, Garred P, Koch C, Høiby N. Early rise of anti-pseudomonas antibodies and a mucoid phenotype of pseudomonas aeruginosa are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study. *J Cyst Fibros*. 2006 Jan;5(1):9-15
- 73- Shand GH, Pedersen SS, Brownt MRW, Hoiby N. Serum antibodies to Pseudomonas aeruginosa outer-membrane proteins and iron-regulated membrane proteins at different stages of chronic cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol*. 1991. 34:203-212
- 74- Cordon SM, Elborn JS, Rayner RJ, Hiller EJ, Shale DJ. IgG antibodies in early Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1992. 67:737-740
- 75- Jagger KS, Robinson DI, Franz MN, Warren RL. Detection by enzyme-linked immunosorbent assays of antibody specific for Pseudomonas proteases and exotoxin A in sera from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 1982. 6: 1054-1058
- 76- Hollsing AE, Granstrom M, Vasil ML, Wretlind B, Strandvik B. Prospective study of serum antibodies to Pseudomonas aeruginosa exoproteins in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1868–1874
- 77- Granström M, Ericsson A, Strandvik B, Wretlind B, Pavlovskis OR, Berka R et al. Relation between antibody response to Pseudomonas aeruginosa exoproteins and colonization/infection in patients with cystic fibrosis. *Acta Pediatr Scand*. 1984. 73:772-777
- 78- Gibson RL, Emerson J, McNamara S, Burns JL, Rosenfeld M, Yunker A et al. Significant microbiological effect of inhaled tobramycin in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167(6):841-9
- 79- Ratjen F, Doring G, Nikolaizik WH. Effect of inhaled tobramycin on early Pseudomonas aeruginosa colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 2001; 358:983–984
- 80- West SE, Zeng L, Lee B, Kosorok MR, Laxova A, Rock M et al. Respiratory infections with Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA* 2002;287:2958–2967

- 81- Brett MM, Ghoneim TM, Littlewood JM. Prediction and diagnosis of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: a follow-up study. *J Clin Microbiol.* 1988. 26: 1565-1570
- 82- Corech R, Rao A, Laxova A, Moss J, Rock J, Li, Z et al. Early immune response to the components of the type III system of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005. 43: 3956-3962
- 83- Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9:492–7
- 84- Kappler M, Kraxner A, Reinhardt D, Ganster B, Griese M, Lang T. Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax.* 2006, 61: 684-688
- 85- Ratjen F, Walter H, Haug M, Meisner C, Grasemann H, Doring G. Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Pediatric Pulmonol.* 2007, 42: 249-255.
- 86- Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Sliker MG, Terheggen-Lagro SWJ, van Berkhout F, Kimpen JLL et al. Diagnostic value of serological test against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. *Thorax* 2006;61: 689-693
- 87- da Silva Filho LV, Tateno AF, Martins KM, Azzuz Chernishev AC, Garcia De O, Haug M et al. The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:938–944
- 88- Caballero E, Drobic ME, Perez MT, Manresa JM, Ferrer A, Orriols R. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody detection in patients with bronchiectasis without cystic fibrosis. *Thorax* 2001; 56:669:74

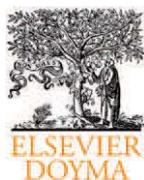
- 89- Granström M, Wretling B, Markman B, Pavlovskis OR, Vasil ML. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins. *Eur J Clin Microbiol*. 1985 Apr;4(2):197-200
- 90- Hogardt M, Trebesius K, Geiger A M, Hornef M, Rosenecker J, Heesemann J. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000, 1137: 818–825
- 91- De Vos D, Lim A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L et al. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1295-1299
- 92- Van Belkum A, Renders NHM, Smith S, Overbeek SE, Verbrugh HA. Comparison of conventional and molecular methods for the detection of bacterial pathogens in sputum samples from cystic fibrosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000, 27:51-57
- 93- da Silva Filho, LVF, Levi JE, Bento CNO, Da Silvo Ramos SRT, Rozov T. PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*.1999. 48:357–361
- 94- Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1994, 60: 3739-3745
- 95- Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2003, 41:4312-4317
- 96- Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:2074–2079

- 97- Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S, Cournoyer B. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J Microbiol Methods*. 2007; 70(1):20-9
- 98- Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn JS. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa*-comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004; 3:21
- 99- Döring G, Unertl K, Heininger A. Validation criteria for nucleic acid amplification techniques for bacterial infections. *Clin Chem Lab Med* 2008, 46:909-918
- 100- Motoshima M, Yanagihara K, Fukushima K, Matsuda J, Sugahara K, Hirakata Y et al. Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007, 58:53-58.
- 101- Anuj SN, Whiley DM, Kidd TJ, Bell S, Wainwright CE Michael D et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009, 63: 127–131.
- 102- Deschaght P, Schelstraete P, Lopes dos Santos SG, van Simaey L, Haerynck F, Vandaele S et al. Comparison of culture and qPCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in not chronically infected cystic fibrosis patients. *BMC Microbiology* 2010 10: 245-250. Disponible en <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/245>
- 103- Logan C, Habington A, Lennon G, Cronin F, O'Sullivan N Evaluation of the efficacy of real-time polymerase chain reaction for the routine early detection of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum and throat swab specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010. 68: 358–365
- 104- Billard-Pomares T, Herwegh S, Wizla-Derambure N, Turck D, Courcol R, Husson MO. Application of quantitative PCR to the diagnosis and monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in 5-18-year-old cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*. 2011, 60:157-61.

- 105- Burns JL, Rolain JM. Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: can we simplify the complexity?. *J Cyst Fibros*. 2014, 13:1-9.
- 106- McCulloch E, Lucas C, Ramage G, Williams C. Improved early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time PCR to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population. *J Cyst Fibros*. 2011, 10:21-4.
- 107- Anstead M, Heltshe SL, Khan U, Barbieri JT, Langkamp M, Döring G et al. *Pseudomonas aeruginosa* serology and risk for re-isolation in the EPIC trial. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2013,12: 147–153.
- 108- Pressler T, Karpati F, Granström M, Knudsen P, Lindblad A, Hjelte L et al and Scandinavian CF Study Consortium. Diagnostic significance of measurements of specific IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* by three different serological methods. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2009, 8:37–42
- 109- Douglas TA, Brennan S, Berry L, Winfield K, Wainwright CE, Grimwood K et al on behalf of the members of AREST CF and the ACFBAL Trial. Value of serology in predicting *Pseudomonas aeruginosa* infection in young children with cystic fibrosis. *Thorax*. 2010;65:985e990

8-ANEXO

Experiencia previa publicada



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística

Antonio Oliver^{a,*}, Teresa Alarcón^b, Estrella Caballero^c y Rafael Cantón^d

^a Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital de la Princesa, Madrid, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España

^d Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de mayo de 2008

Aceptado el 27 de mayo de 2008

On-line el 20 de febrero de 2009

Palabras clave:

Fibrosis quística

Infección respiratoria crónica

Diagnóstico microbiológico

Pseudomonas aeruginosa

Burkholderia cepacia

Staphylococcus aureus

RESUMEN

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población de origen caucásico. Está producida por mutaciones en el gen que codifica el regulador de la conductancia transmembrana de FQ. Este defecto conduce, entre otras, a la alteración de las secreciones respiratorias, lo que determina una predisposición para la colonización-infección broncopulmonar crónica, causa principal de la elevada morbilidad y temprana mortalidad de estos pacientes. La colonización por *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* es frecuente en niños menores de 10 años, aunque *Pseudomonas aeruginosa* con morfotipo mucóide es, con diferencia, el microorganismo más relevante en el adulto y causa principal del deterioro broncopulmonar progresivo. Como consecuencia del tratamiento antimicrobiano repetido y la alteración pulmonar se favorece el desplazamiento de los patógenos habituales y se aíslan con mayor frecuencia bacilos gramnegativos no fermentadores, entre los que destacan *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp. y *Burkholderia cepacia* complex. Las connotaciones particulares del propio proceso patológico y de los microorganismos implicados hacen recomendable reconocer el seguimiento microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con FQ como una entidad diagnóstica propia.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF), a condition produced by mutations in the gene that encodes the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, is the most prevalent autosomal-recessive hereditary disease in caucasian populations. Among other repercussions, this defect leads to an alteration of respiratory secretions and determines a predisposition for chronic bronchopulmonary colonization-infection, which is the main driver of the high morbidity and early mortality of CF patients. Colonization by *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* is frequent in children younger than 10 years, but mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is by far the most relevant pathogen in adults with CF and is responsible for the progressive bronchopulmonary deterioration. As a consequence of repeated, long-lasting antimicrobial treatments and deterioration of lung function, colonization by multidrug-resistant Gram-negative bacilli, such as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp. and *Burkholderia cepacia* complex, is also frequent in adult CF patients. The special characteristics of the pathologic process and the microorganisms implicated in CF make it advisable to consider microbiological follow-up of chronic bronchopulmonary colonization-infection in these patients a specific diagnostic entity.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Cystic fibrosis

Chronic respiratory infection

Diagnostic microbiology

Pseudomonas aeruginosa

Burkholderia cepacia

Staphylococcus aureus

Introducción

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población de origen caucásico

y la primera causa de afección pulmonar crónica en la infancia. Su frecuencia estimada oscila entre 1/2.500 y 1/5.000 recién nacidos vivos, lo que establece una frecuencia de 1 portador por cada 25–50 individuos en la población general, aunque se observan

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: aoliver@hds.es (A. Oliver).

importantes diferencias dependientes de los grupos étnicos y regiones geográficas.

La FQ se produce como consecuencia de mutaciones en el gen que codifica el regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), situado en el brazo largo del cromosoma 7. El CFTR actúa como canal de cloro y se encuentra en todos los tejidos exocrinos. La mutación más común es la delección de la fenilalanina 508 ($\Delta F508$), que se encuentra hasta en el 70% de los individuos con FQ. El defecto en el transporte del ión cloro causa que estos pacientes tengan un sudor característicamente salado y conduce a una deshidratación de las secreciones del tracto respiratorio, pancreáticas, hepáticas, intestinales y genitourinarias aumentando su viscosidad. Como consecuencia, las principales manifestaciones clínicas son respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias¹.

Las alteraciones digestivas fueron la causa de la temprana mortalidad de estos pacientes hasta mediados del siglo pasado, lo que determinó que hasta el 70% de los niños con FQ falleciera antes de cumplir el primer año de vida. Los tratamientos específicos para corregir las deficiencias digestivas en primera instancia, seguidos posteriormente de otros para combatir las infecciones respiratorias por *Staphylococcus aureus*, el primer patógeno relacionado con la FQ, determinaron un aumento notable de la esperanza de vida de los pacientes con FQ, situada ya en los 36,5 años según el último informe de la Fundación Americana para la Fibrosis Quística². A partir de la segunda mitad del siglo xx, en parte consecuencia de estos avances, empieza a cobrar relevancia la infección broncopulmonar crónica por *Pseudomonas aeruginosa*, que ya desde hace décadas se sitúa como la principal causa de las todavía elevadas morbilidad y mortalidad relacionadas con la FQ³.

Consideraciones clínicas y microbiológicas de la colonización-infección broncopulmonar crónica en la fibrosis quística

Patogénesis de la colonización/infección broncopulmonar

La actividad mucociliar es una de las principales barreras del tracto respiratorio frente a los microorganismos y otros agentes extraños. El epitelio ciliado transporta la secreción mucosa por el árbol traqueobronquial arrastrando a su paso cualquier partícula o microorganismo que encuentre en su camino. Para que este mecanismo sea efectivo, el moco, que ocupa la parte central de la vía, debe deslizarse sobre la superficie serosa que envuelve los cilios de las células del epitelio bronquial. La alteración del CFTR da lugar a un aumento de la reabsorción de cloro y sodio que se acompaña de una reabsorción pasiva de agua y produce deshidratación de la superficie del epitelio ciliado respiratorio, que impide el correcto deslizamiento del moco a través del árbol traqueobronquial^{1,3}. Esto conlleva un estancamiento del moco, el cual servirá de caldo de cultivo idóneo para diversos microorganismos. Otro factor patogénico añadido es la respuesta inflamatoria exagerada, causada por la propia infección y por la alteración presente en el epitelio bronquial, y que se manifiesta principalmente por un intenso infiltrado de neutrófilos, los cuales, mediante la secreción de proteasas, dañarán aún más el tejido bronquial. Además, el acúmulo de ADN, liberado principalmente por la lisis de los neutrófilos, incrementa la densidad y la viscosidad de las secreciones.

Además de la propia alteración cualitativa y cuantitativa de las secreciones mucosas y el deficiente aclaramiento mucociliar, hay varias hipótesis, no sin cierta controversia, que tratan de justificar la enorme predisposición de los pacientes con FQ para la infección broncopulmonar crónica por patógenos bacterianos determinados, particularmente por *P. aeruginosa*^{3,4}. Entre ellas, cabría

destacar especialmente tres: a) la alteración del CFTR conduce a la deshidratación de las secreciones respiratorias, con importante aumento de su osmolaridad, lo cual determina la inactivación de las betadefensinas, péptidos antibacterianos naturales que forman parte del sistema inmunitario innato; b) las células epiteliales de los pacientes con FQ son deficientes en la sialización de gangliósidos. Los asialogangliósidos actuarían como receptores para *P. aeruginosa* aumentando su adhesión al epitelio y, por lo tanto, su persistencia en las vías respiratorias, y c) el CFTR actúa como receptor para el LPS, de tal forma que su alteración determina una aclaramiento de *P. aeruginosa* por las células epiteliales entre 10 y 50 veces menor en los pacientes con FQ, lo que favorece su persistencia en las vías respiratorias.

Finalmente, varios estudios han demostrado que la concentración de hierro está aumentada en las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ, lo cual parece favorecer la persistencia de la colonización por *P. aeruginosa*, según muestra un trabajo reciente. Asimismo, estudios recientes indican que la alteración del CFTR en los macrófagos alveolares reduce la acidificación de los fagolisosomas, lo cual, limita su capacidad bactericida y, por lo tanto, promueve la persistencia de la infección. De igual forma, las células del epitelio respiratorio de los pacientes con FQ son incapaces de secretar tiocianato, por lo que disminuye drásticamente su capacidad bactericida a través de la formación de moléculas de oxígeno reactivo.

Por lo tanto, debido a todos estos condicionantes, el paciente con FQ padecerá un cuadro de infección broncopulmonar crónica que se irá exacerbando a lo largo de su vida y que, a pesar de los avances en la antibioterapia y en el tratamiento con agentes mucolíticos y enzimas que rompen el ADN acumulado, sigue siendo, con diferencia, la causa principal de su peor calidad de vida y menor expectativa de supervivencia.

Cronoinfección broncopulmonar en la fibrosis quística

El análisis del patrón y la evolución temporal de la colonización en los pacientes con FQ ha permitido definir el concepto de cronoinfección por el que los pacientes sufrirían infecciones o colonizaciones siguiendo una secuencia más o menos establecida dependiente de la edad^{3,5,6}. En los de menor edad, las infecciones por virus respiratorios y micoplasmas no son infrecuentes. Con posterioridad y aun en la primera década de la vida, es frecuente el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* que serían rápidamente relegados a un segundo plano y sustituidos por *S. aureus* y posteriormente por *P. aeruginosa*. En la edad adulta, más del 80% de los pacientes están crónicamente colonizados por este microorganismo y en la mayoría de los casos se aísla en su morfotipo mucoso.

Como consecuencia del tratamiento antimicrobiano repetido en los pacientes adultos y del deterioro de la función pulmonar, se favorece el desplazamiento de los patógenos bacterianos habituales y se aíslan con mayor frecuencia bacilos gramnegativos no fermentadores entre los que destacan *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp. y *Burkholderia cepacia*. En el Hospital Ramón y Cajal, en el seguimiento de 81 pacientes con FQ durante 5 años, se observó una mayor incidencia de *S. aureus* en los primeros años de vida y un ulterior aumento de los pacientes colonizados con *P. aeruginosa* (fig. 1). Estos datos son muy similares a los del registro estadounidense de pacientes con FQ². El aislamiento de las micobacterias atípicas en las secreciones respiratorias en pacientes adultos no es infrecuente. El tratamiento prolongado con antimicrobianos en la edad adulta también facilita el asentamiento de levaduras y hongos filamentosos, que complican aún más el patrón de colonización bronquial. Por último, el patrón de colonización bronquial no siempre es

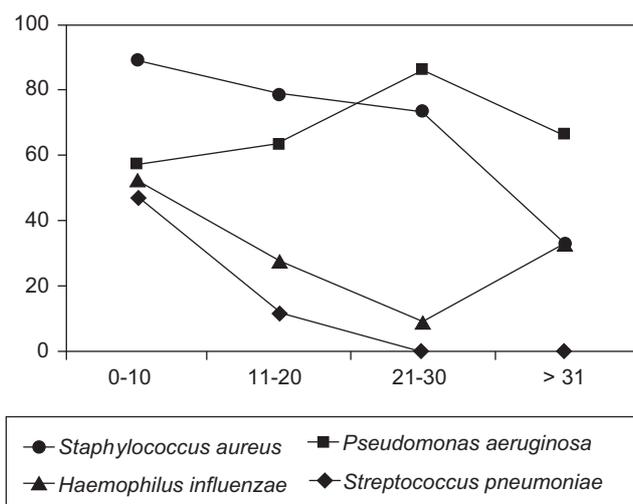


Figura 1. Patrón de colonización (porcentaje de aislamiento) por intervalos de edades en pacientes con fibrosis quística. Seguimiento de 5 años de 81 pacientes en la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

monomicrobiano y hasta en el 70% de los pacientes 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*.

Principales microorganismos implicados en la colonización-infección broncopulmonar crónica

Pseudomonas aeruginosa

Es con diferencia el microorganismo más frecuente en estos pacientes. Cerca del 60% de ellos está crónicamente colonizado por este microorganismo, que llegando al 80% en pacientes mayores de 18 años. La colonización-infección por *P. aeruginosa* se relaciona claramente con mayores morbilidad y mortalidad en el paciente con FQ. Se ha evidenciado un progresivo deterioro de la función pulmonar y una disminución de la supervivencia, y se ha comprobado que su adquisición en edades tempranas influye negativamente en el pronóstico de la enfermedad¹. Los pacientes colonizados por *P. aeruginosa* durante los primeros 5 años de vida tienen un riesgo mayor de mortalidad (2,6 veces) que el de los pacientes con FQ no colonizados por este microorganismo. También se observan unos valores significativamente más bajos de FEV₁ (volumen espiratorio forzado en el primer segundo), menor percentil de peso y aumento del número de hospitalizaciones. Los factores de riesgo para la colonización-infección temprana por *P. aeruginosa* incluyen la infección previa por *S. aureus*, el sexo femenino, la presencia homocigótica de la mutación $\Delta F508$ y el contacto previo con pacientes adultos con FQ.

La adquisición de este patógeno se produce a partir de microorganismos presentes en el ambiente, aunque la transmisión cruzada entre pacientes no es del todo infrecuente, particularmente entre miembros de una misma familia. Asimismo, se han descrito brotes epidémicos de colonización-infección por *P. aeruginosa* en varias unidades de FQ⁷.

Inicialmente, la colonización del tracto respiratorio se produce por morfotipos no mucosos, generalmente sensibles a los antimicrobianos, y se presenta con una baja densidad bacteriana. Con posterioridad, y durante un período de tiempo variable, los

cultivos de las muestras respiratorias pueden ser intermitentes. Una vez establecida la colonización-infección pulmonar crónica, generalmente por una única línea clonal de *P. aeruginosa*, resulta prácticamente imposible conseguir la erradicación.

El proceso de adaptación determinante de la persistencia (en la mayoría de los casos de por vida) de *P. aeruginosa* en las vías respiratorias de los pacientes con FQ incluye cambios tanto fisiológicos como genéticos⁸. Entre los primeros destaca la transición desde el estado de crecimiento planctónico (células libres suspendidas en medio acuoso) al de crecimiento en biopelículas o *biofilms*. Las biopelículas son estructuras supracelulares (comunidades multicelulares) complejas y bien organizadas espacial y funcionalmente que crecen sobre una superficie viva o inerte. La transición al crecimiento en forma de biopelículas depende de la acción de los sistemas de comunicación intercelular *lasR-lasI* y *rhlR-rhlI*, que son activados cuando la población alcanza una suficiente densidad, y por ello se denominan sistemas sensores de quorum (*quorum sensing*). El crecimiento en forma de biopelículas confiere al microorganismo una notable resistencia tanto a los tratamientos antibióticos como a la propia respuesta inmunitaria del paciente, que favorece su persistencia.

Además del crecimiento en forma de biopelículas, el desarrollo de la infección crónica por *P. aeruginosa* se materializa a través de un intenso proceso de adaptación genética, que será determinante para su resistencia a las condiciones ambientales (incluidos nuevamente la respuesta inmunitaria y los antibióticos). Fruto de esta intensa adaptación emergen gran cantidad de variantes fenotípicas características de la infección crónica, entre las que destacan la hiperproducción constitutiva de alginato (morfo tipo mucoso) o los variantes de lento crecimiento (colonias enanas o *small colony variants*, SCV). Otras variantes fenotípicas que parecen favorecer la persistencia en las vías respiratorias son los mutantes aflagelados o con modificaciones del LPS. Se ha comprobado que la conversión al morfotipo mucoide se correlaciona con producción de anticuerpos y se acompaña de cambios importantes en los parámetros pulmonares, lo que conlleva una mayor mortalidad⁹. Asimismo, el incremento en el número de variantes morfológicas se ha correlacionado con el progresivo deterioro de la función pulmonar. Recientemente se ha comprobado que el intenso proceso de adaptación genética durante la colonización crónica favorece la persistencia del microorganismo en las vías respiratorias¹⁰.

Estas características, a pesar de no formar parte de los mecanismos específicos de resistencia a antibióticos, establecen una línea base de resistencia in vivo propicia para el desarrollo y la selección de variantes con resistencia a múltiples antibióticos (cepas multirresistentes), como consecuencia del uso prolongado de antibióticos. Este hecho se ve facilitado debido a que *P. aeruginosa* tiene una extraordinaria capacidad de desarrollar resistencia mediante mutaciones cromosómicas a prácticamente todos los antibióticos utilizados, incluidos los betalactámicos, los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas. Finalmente, este desalentador panorama se agrava por la elevada prevalencia en los pacientes con FQ de cepas hipermutadoras, que presentan una frecuencia de mutación espontánea (para cualquier gen, incluyendo los implicados en la resistencia a antibióticos u otras mutaciones adaptativas, como las anteriormente mencionadas) hasta 1.000 veces mayor de lo normal. Entre el 30 y el 60% de los pacientes con FQ están colonizados por cepas hipermutadoras, según varios estudios, hecho extremadamente infrecuente (<1%) en pacientes con infecciones agudas¹¹. La base molecular del fenotipo hipermutador es, en la mayoría de los casos, la deficiencia de alguno de los genes que forman parte del sistema de reparación de emparejamientos erróneos de ADN. Las cepas hipermutadoras aisladas de los pacientes con FQ son mucho más resistentes a los antibióticos que las no hipermutadoras; de hecho,

la mayor prevalencia de cepas resistentes en los pacientes con FQ que en otros procesos se debe, en gran parte, a la contribución de las cepas hipermutadoras a las cifras de resistencia. Asimismo, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que las cepas hipermutadoras desarrollan resistencia en pocas horas a prácticamente todos los antibióticos antipseudomónicos cuando se utilizan en monoterapia¹². Recientemente se ha documentado que la hipermutación y su relación con la resistencia a los antibióticos no son exclusivas de la FQ, sino que también son muy frecuentes en el contexto de otras enfermedades respiratorias crónicas como bronquiectasias o en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)¹³.

Staphylococcus aureus

Fue el primer microorganismo reconocido como causante de infección pulmonar crónica en pacientes con FQ. En la era preantibiótica fue uno de los principales implicados en la elevada y temprana mortalidad de estos pacientes. La terapia antiestafilocócica ha conseguido en las últimas décadas una notable reducción de la morbilidad y la mortalidad por este microorganismo, pero aún sigue siendo, después de *P. aeruginosa*, uno de los principales patógenos implicados en la infección broncopulmonar, especialmente en niños menores de 10 años. Los datos de 2005 del registro de pacientes de la Fundación Americana de FQ muestran que, de forma general, el 52% de los pacientes están colonizados por *S. aureus*². Además, es el principal patógeno aislado durante los primeros 10 años de vida y alcanza su mayor prevalencia (>60%) en el grupo de 6-10 años de edad.

La persistencia de *S. aureus* depende fundamentalmente de su capacidad de adhesión al epitelio respiratorio y para evadir la respuesta inmunitaria una vez producida la colonización. Investigaciones recientes indican que *S. aureus* escapa más eficientemente de los fagosomas de las células del epitelio bronquial deficientes en el CFTR¹⁴. Además, se desarrolla adecuadamente en medios con alta osmolaridad, situación que se produce en las vías respiratorias del paciente con FQ. *S. aureus* puede persistir en las vías respiratorias de los pacientes con FQ sin producir alteraciones aparentes. No obstante, se ha apuntado que causa una lesión inicial con escasa repercusión funcional que predispondría a la colonización posterior por *P. aeruginosa*. Si bien el tratamiento profiláctico con betalactámicos ha mejorado notablemente el pronóstico de los niños con FQ, hay cierta controversia en torno al tratamiento indiscriminado, ya que un tratamiento prolongado podría llevar a la sustitución de *S. aureus* por *P. aeruginosa* y, por lo tanto, a adelantar el proceso evolutivo de la infección crónica y el deterioro pulmonar. Por otro lado, si bien la resistencia a meticilina no ha sido tradicionalmente un problema importante en los pacientes con FQ, la situación parece estar cambiando. Los datos de 2005 de la Fundación Americana muestran que actualmente hasta el 17,2% de los pacientes con FQ están colonizados por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Recientemente se ha documentado la infección respiratoria por clones de SARM de origen extrahospitalario productores de la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) en pacientes con FQ de Estados Unidos, situación que podría modificar la patogenia de la infección-colonización por este microorganismo. La situación actual en España de la resistencia a la meticilina en el contexto de FQ ha sido poco estudiada, pero puesto que se han detectado recientemente los primeros casos de SARM de origen extrahospitalario, podría seguir el mismo camino descrito en América y, por lo tanto, será necesario mantener una vigilancia activa de este fenómeno en los próximos años.

Otro fenómeno preocupante desde el punto de vista de la resistencia a antibióticos es la alta prevalencia (el 14% según un

estudio publicado) de cepas hipermutadoras de *S. aureus* en los pacientes con FQ, al igual que ocurre para *P. aeruginosa*¹⁵. Si bien la hipermutación aparentemente no contribuye al desarrollo de resistencia a la meticilina, puesto que ésta se produce por la adquisición de determinantes exógenos de resistencia y no por mutación, sí contribuye notablemente al desarrollo de resistencia a antibióticos como los macrólidos; facilitando la selección de mutaciones en genes ribosómicos. En cualquier caso, la resistencia a macrólidos es cada vez más frecuente en las cepas de *S. aureus* de pacientes con FQ, al menos en parte debido al uso extendido de la terapia de mantenimiento con azitromicina. Asimismo, el tratamiento profiláctico prolongado con cotrimoxazol se ha relacionado con la selección de cepas dependientes de timidina por inactivación del gen *thyA* que codifica para la timidilato sintetasa. Estas cepas, además de ser resistentes al cotrimoxazol, se caracterizan por producir colonias con morfologías anómalas (SCV) que incluso muchas veces no crecen en medios convencionales y pueden pasar inadvertidas¹⁶. Estudios recientes demuestran que la coinfección con *P. aeruginosa* (situación que ocurre de forma frecuente) también determina la selección de variantes SCV de *S. aureus*. Este hecho, además de plantear dificultades diagnósticas, conlleva una mayor resistencia a los antibióticos y una mayor capacidad de persistencia en las vías respiratorias de estos pacientes.

Haemophilus influenzae

Aunque su frecuencia de aislamiento varía según el protocolo microbiológico aplicado, en la mayoría de los trabajos es el tercer microorganismo más frecuentemente aislado en los pacientes con FQ después de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Su frecuencia aumenta si se emplean medios selectivos o incubación en atmósfera con anaerobiosis^{5,17}.

H. influenzae puede colonizar hasta al 30% de los pacientes con FQ. Su incidencia es mayor en los niños de menor edad, si bien también puede aislarse en los pacientes adultos. No hay evidencias claras sobre su papel como factor primario en el deterioro de la función pulmonar y su efecto patogénico estaría en relación con la carga bacteriana elevada y la respuesta inflamatoria generada. Aunque no es habitual, hay pacientes con colonización crónica, por nuevas cepas o por cepas persistentes, que siguen un patrón similar al que presentan los bronquíticos crónicos. En los pacientes con FQ se ha encontrado relación con las exacerbaciones durante el periodo de colonización crónica que suelen ser generalmente breves, remiten con el tratamiento antimicrobiano adecuado e incluso puede erradicarse hasta en el 70% de los casos de las secreciones respiratorias. Cuando esto ocurre, se reducen los anticuerpos contra este microorganismo y se evidencia una mejoría clínica con desaparición o reducción de los síntomas.

Las cepas de *H. influenzae* que se aíslan en el paciente con FQ son típicamente no capsuladas, característica común con los encontrados en otras enfermedades respiratorias que cursan con cronicidad^{18,19}. Por ello la vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b no tendría utilidad en la prevención de la colonización en el paciente con FQ. El biotipo más frecuentemente aislado en estos pacientes es el I, que es uno de los que conllevan una mayor virulencia.

Aunque no hay evidencia clínica, hay acuerdo generalizado del beneficio del tratamiento antimicrobiano en los pacientes con FQ colonizados por este patógeno. Las pautas aplicadas no difieren de las utilizadas en las infecciones respiratorias por este agente en otro tipo de pacientes. Entre el 20 y el 40% de los aislados de *H. influenzae* son resistentes a la amoxicilina debido a la producción de betalactamasas. Un número relativamente

importante de las cepas de *H. influenzae* en los pacientes con FQ es resistente a amoxicilina sin producir betalactamasa. Este fenotipo, denominado BLNAR (*beta-lactamase-negative ampicillin-resistant*), es debido a alteraciones en las PBP que confieren también pérdida de sensibilidad a la asociación de amoxicilina-clavulánico y cefalosporias orales. Su incidencia en un amplio estudio realizado con pacientes seguidos en la Unidad de FQ del Hospital Universitario Ramón y Cajal fue algo mayor del 5%, pero podrían estar aumentando en los últimos años¹⁹.

Se ha descrito la persistencia prolongada en los pacientes con FQ, incluso de años, de cepas de *H. influenzae* multirresistentes a pesar del tratamiento adecuado con antimicrobianos. Este perfil de multirresistencia parece estar relacionado, al igual que en *P. aeruginosa*, con cepas hipermutadoras. En España, se han descrito casos de pacientes persistentemente colonizados por *H. influenzae* resistentes a las fluoroquinolonas. Este hallazgo es excepcional y la selección del mecanismo de resistencia implicado en ello, alteraciones en *gyrA* y *parC*, se relaciona con la administración previa de fluoroquinolonas y el fenotipo hipermutador^{19,20}.

Streptococcus pneumoniae

En la mayoría de las series, su incidencia no supera el 20%, y es mayor en las etapas iniciales de la enfermedad, en que puede llegar hasta el 50%. En el Hospital Universitario Ramón y Cajal durante el seguimiento de los pacientes atendidos en su Unidad de FQ entre 1995 y 2003, se encontró una incidencia general anual media del 5,5%; todos los pacientes en los que se aisló tenían menos de 12 años edad²¹. En el 35% de los casos, su aislamiento tenía relación con un episodio de exacerbación, aunque sólo en el 27% de éstos se identificó como único patógeno durante estos episodios. La utilización de medios selectivos, por ejemplo agar sangre suplementado con ácido nalidíxico y colistina, no parece incrementar el porcentaje de aislamientos de *S. pneumoniae* en los pacientes con FQ.

En cuanto al aspecto de la patogenia, *S. pneumoniae* se comportaría como *S. aureus*, que es capaz de adherirse a la superficie mucosa, lo que favorece las infecciones broncopulmonares crónicas. Otro posible factor de virulencia, común con *P. aeruginosa* y *S. aureus*, es su capacidad para elaborar productos extracelulares que estimulan la secreción mucosa y contribuyen a una peor evolución de las exacerbaciones. Recientemente se ha demostrado una mayor facilidad de los aislados de *S. pneumoniae* obtenidos de los pacientes con FQ para formar biopelículas en comparación con los obtenidos de enfermedades invasivas y que también explicaría su posible facilidad para permanecer en el árbol bronquial²². Al igual que *H. influenzae*, puede producirse una persistencia de clones específicos en muchos casos multirresistentes, que presentan tasas de mutación mayores que la de los aislados que no proceden de estos pacientes. La detección, en estos pacientes, de serotipos similares a los que cubre la vacuna heptavalente contra *S. pneumoniae* justificaría su utilización y podría reducir el estado de portador por serotipos multirresistentes.

Burkholderia cepacia complex

Se ha comprobado que los organismos identificados como *B. cepacia* forman un grupo muy heterogéneo y constituyen un complejo de especies fenotípicamente similares²³. Hay al menos 9 variedades genómicas dentro del complejo: *B. cepacia* (variedad genómica I), *B. multivorans* (variedad genómica II), *B. cenocepacia* (variedad genómica III), *B. stabilis* (variedad genómica IV), *B. vietnamiensis* (variedad genómica V), *B. dolosa* (variedad

genómica VI), *B. ambifaria* (variedad genómica VII), *B. anthina* (variedad genómica VIII) y *B. pyrrocinia* (variedad genómica IX) y otras 15 especies dentro del género *Burkholderia*²⁴. La variedad genómica I es un patógeno de plantas y contiene la especie tipo. La mayoría de los aislamientos de pacientes con FQ se incluyen dentro de *B. cenocepacia* y *B. multivorans*.

B. cepacia apareció hace más de 25 años como un importante patógeno oportunista en estos pacientes. Con frecuencia, la infección pulmonar producida por esta bacteria es crónica, difícil de tratar con antimicrobianos por su multirresistencia y conlleva importantes morbilidad y mortalidad. En estos pacientes, se ha asociado con lo que se ha denominado síndrome cepacia, que se caracteriza por fiebre alta, bacteriemia, bronconeumonía, deterioro pulmonar rápido y muerte en más del 60% de los casos. La transmisión entre pacientes se puede producir por contacto directo o indirecto con secreciones de pacientes infectados y se facilita por contacto prolongado entre pacientes con FQ, por compartir equipos, por contacto social, tanto en el medio hospitalario como en reuniones, campamentos, etc.²⁴. En algunos centros se excluye a los pacientes colonizados con *B. cepacia* de los programas de trasplante pulmonar, debido al mal pronóstico^{23,24}. Sin embargo, para otros autores sería necesario valorar la infección con diferentes especies dentro del complejo de forma individualizada.

Los estudios epidemiológicos indican que las diferentes variedades genómicas son diversas en cuanto a su frecuencia de transmisión y patogenia²⁴. *B. cenocepacia* es frecuente en suelo agrícola, pero no en sitios urbanos, y hasta ahora no está claramente demostrado que los pacientes se contagien de fuentes ambientales. Conlleva una elevada transmisión y mal pronóstico y la transmisión entre pacientes se relaciona con uno o dos marcadores genéticos: gen *cblA* («cable Pili») y BCESM (*B. cepacia* epidemic strain marker), aunque no se ha encontrado en las cepas de todos los brotes. *B. gladioli* es un patógeno de plantas aislado tradicionalmente del gladiolo y el arroz. Se ha aislado de muestras de pacientes con FQ, y se ha identificado por su capacidad para crecer en medios selectivos para el aislamiento de *B. cepacia*. *B. gladioli* y *B. cepacia* complex son genotípicamente diferentes pero fenotípicamente muy similares y es difícil diferenciarlas mediante técnicas convencionales²⁵.

Stenotrophomonas maltophilia, *Achromobacter* spp. y otros bacilos gramnegativos no fermentadores

S. maltophilia y *Achromobacter xylosoxidans* se encuentran más frecuentemente que *B. cepacia* complex en pacientes con FQ y enfermedad pulmonar avanzada, pero generalmente son menos virulentos.

S. maltophilia es un bacilo gramnegativo no fermentador, oxidasa negativo y resistente a la mayoría de los antimicrobianos. Hay factores que predisponen a la colonización por este microorganismo, como el uso prolongado de antimicrobianos. Sin embargo, parece que no predispone la hospitalización previa o el contacto con personas colonizadas, aunque sí se ha descrito colonización con la misma cepa en diferentes pacientes²⁴. *S. maltophilia* suele producir una colonización transitoria, aunque en alrededor del 10% de los casos se ha documentado colonización crónica²⁶. En un estudio, se observó una peor supervivencia a los 5 años de los pacientes con *S. maltophilia*; sin embargo, en otros no se evidencia un deterioro clínico relacionado con esta bacteria²⁵. La prevalencia de colonización en pacientes con FQ ha aumentado en los últimos años, aunque varía de unos centros a otros, en parte, por el uso de diferentes medios selectivos o por los métodos de identificación que pueden dar lugar a identificaciones erróneas²⁴.

A. xylosoxidans es también un bacilo gramnegativo que puede confundirse con *P. aeruginosa* no pigmentada o con *B. cepacia*²⁵. No hay estudios que examinen el efecto de esta bacteria en la función pulmonar y en la mortalidad. En un estudio, se ha relacionado con exacerbaciones pulmonares en FQ, pero los pacientes estaban colonizados también por *P. aeruginosa*. No parece que la colonización a largo plazo produzca un deterioro claro del estado clínico. Se han descrito casos de pacientes colonizados con la misma cepa en el mismo centro, y aunque no se encontró la fuente, estuvieron hospitalizados al mismo tiempo²⁴.

Ralstonia, género establecido en 1995, agrupa diferentes especies patógenas en humanos: *R. pickettii*, *R. pauca*, *R. gilardii* y *R. mannitolilytica*²⁵. Son bacilos gramnegativos no fermentadores, oxidasa positivos, y se consideran patógenos oportunistas que pueden producir infecciones graves en pacientes inmunodeficientes. Estos organismos pueden crecer en los medios selectivos para *B. cepacia*, y con los métodos fenotípicos convencionales se pueden identificar de forma errónea¹⁷.

Pandora es un bacilo gramnegativo no fermentador que se ha aislado de muestras ambientales, muestras clínicas y recientemente en muestras de pacientes con FQ, que es capaz de crecer en medios selectivos para *B. cepacia*. Este género, descrito en 2000, contiene 5 especies: *P. apista*, *P. sputorum*, *P. norimbergensis*, *P. pnomenusa* y *P. pulmonicola* y otras 4 genoespecies todavía sin nombre (variedad genómica 1 a 4). El género más cercano filogenéticamente es *Burkholderia* y comparte características fenotípicas con *Ralstonia*. Parece que son potencialmente patógenos en pacientes con FQ y se ha descrito transmisión entre pacientes. Clínicamente es más virulenta que *Ralstonia* spp. o *B. gladioli*. La identificación fenotípica no es fiable y requiere técnicas moleculares¹⁷. Es resistente a muchos antimicrobianos, lo que limita las opciones terapéuticas.

Inquilinus sp. es un nuevo género descrito en 2002, al realizar estudios taxonómicos de las bacterias gramnegativas no habituales obtenidas de secreciones respiratorias de pacientes con FQ. Es un bacilo gramnegativo no fermentador que pueden crecer en medios selectivos para *B. cepacia*, pero puede no crecer en MacConkey¹⁷. En este género se incluye la especie *I. limosus* más otra aún sin nombre. Puede tener aspecto mucoso y es resistente a colistina y a todos los betalactámicos, excepto imipenem. No hay datos suficientes para conocer el significado clínico de estas bacterias en estos pacientes.

En pacientes con FQ se han aislado, además, otras bacterias gramnegativas, como *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni*, *Acinetobacter calcoaceticus* o *Chryseobacterium indologenes*.

Enterobacteriaceae

Las enterobacterias se pueden aislar del tracto respiratorio de pacientes con FQ, aunque generalmente son colonizaciones transitorias y no están relacionadas con enfermedad grave¹⁷. Se pueden encontrar en el 1–4% de los pacientes, y en el 10% de los casos de exacerbaciones agudas. Se aíslan con mayor frecuencia en niños de 0 a 5 años, generalmente antes de que se produzca una colonización crónica por *P. aeruginosa*. Entre las enterobacterias, *Escherichia coli* es la que se aísla con mayor frecuencia, seguido de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Proteus* spp. Su detección puede ser compleja cuando está presente *P. aeruginosa* por competencia durante el crecimiento. Aunque no es muy frecuente, las enterobacterias pueden producir infecciones crónicas, desarrollando fenotipos altamente mucoides, similares a los de *P. aeruginosa*, con la que pueden llegar a confundirse a simple vista si no se realiza la prueba de la oxidasa. Al igual que con *P. aeruginosa*, la infección crónica conlleva el

desarrollo de multirresistencia. Ocasionalmente, se ha descrito también la presencia de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido, lo cual dificulta el control de la colonización por estos microorganismos.

Mycobacterium spp.

Los pacientes con FQ tienen un riesgo mayor de sufrir colonización-infección respiratoria por micobacterias no tuberculosas (MNT), probablemente debido a bronquiectasias e infecciones crónicas y recurrentes del pulmón³. A diferencia de lo que ocurre en el caso de la tuberculosis, el contagio se produce muy raramente por contacto persona a persona y el tipificado de las cepas aisladas en los pacientes ha demostrado la ausencia de transmisión cruzada entre ellos. Las MNT tienen una distribución amplia en la naturaleza y se encuentran principalmente en el agua, el suelo, las plantas y los animales. El aumento aparente en el aislamiento de MNT en estos pacientes probablemente esté relacionado con su mayor supervivencia y la mejora en los métodos de detección e identificación de las MNT^{27,28}.

En series publicadas, la prevalencia varía ampliamente, según los centros, del 2 al 28%, si bien la media se situaría entre el 5 y el 15%^{27–29}. Las prevalencias más bajas podrían deberse a series basadas en un solo cultivo, a no utilizar técnicas de descontaminación adecuadas para evitar el sobrecrecimiento de otras bacterias o la poca calidad de las muestras, sobre todo en pacientes pediátricos con dificultades para expectorar.

Las especies que se aíslan más frecuentemente son *M. avium* complex (MAC), *M. avium* con mayor frecuencia que *M. intracellulare*, seguida de *M. abscessus*. La edad de los pacientes parece influir en la frecuencia y las especies de MNT aisladas. En menores de 10–12 años la prevalencia sería del 4–5% y la más frecuente, *M. abscessus*, junto con otras MNT de crecimiento rápido como *M. chelonae* y *M. fortuitum*²⁸. La prevalencia va aumentando con la edad, más del 15% en mayores de 15 años, lo que puede ser un reflejo de la cada vez mayor longevidad de los pacientes con FQ. *M. abscessus* se aísla en un porcentaje similar (5%) a cualquier edad, mientras que MAC se aísla fundamentalmente en mayores de 10–15 años. Otras MNT de crecimiento lento aisladas son *M. gordonae* y más raramente *M. kansasii*. En nuestro país no se ha publicado ningún estudio multicéntrico, pero sí se han notificado algunas series con frecuencia de aislamiento variable, del 4 al 25%²⁹.

Las bacterias de crecimiento rápido en el esputo de los pacientes con FQ pueden ser una causa de que la prevalencia real de MNT esté subestimada. La tasa de cultivos contaminados, en el caso de pacientes con FQ (24–45%), contrasta claramente con la general (2,5–3%) del Laboratorio de Micobacterias. Principalmente *P. aeruginosa*, que se encuentra en el tracto respiratorio de más del 80% de estos pacientes y alrededor de un tercio de los aislados presentan fenotipo mucoso y sobreviven al tratamiento de descontaminación sistemático con N-acetil-L-cisteína+2% NaOH. La inoculación simultánea en medios sólidos, preferentemente Lowenstein-Jensen, y medios líquidos mejora el número de micobacterias recuperadas y disminuye el de muestras finalmente informadas como contaminadas hasta cerca del 17%. Para eliminar eficazmente *P. aeruginosa*, el procesamiento previo de las muestras respiratorias de pacientes con FQ debería incluir tratamiento con ácido oxálico al 5% en un segundo paso, después de la descontaminación con N-acetil-L-cisteína+2% NaOH. Este tratamiento más agresivo reduce eficazmente la contaminación por bacterias de rápido crecimiento hasta un 6–8%, pero puede inactivar entre un 25 y un 30% de las micobacterias, sobre todo en muestras con una carga bacteriana baja. Para minimizar este efecto, se ha propuesto realizar la descontaminación en dos etapas

con N-acetil-L-cisteína+2% NaOH y el ácido oxálico al 5% sólo del cultivo en medio líquido cuando resulte contaminado. De esta forma se puede llegar a obtener hasta un 25% de mejora en la sensibilidad.

Recientemente, se ha descrito la utilización de un método de descontaminación con cicloheximida que mejora el aislamiento de MNT, principalmente *M. abscessus*. Este método es más sencillo y rápido pero tiene el inconveniente de que la muestra descontaminada no puede inocularse a los medios líquidos automatizados. Esto se debe a que la adición de lecitina al medio líquido, necesaria para neutralizar la acción de la cicloheximida, da lugar a fluorescencia inespecífica que impide la lectura automática de los frascos.

La distinción entre infección pulmonar activa y colonización no es fácil en el paciente con FQ. Las recomendaciones publicadas por la American Thoracic Society (ATS) para el diagnóstico de infección pulmonar por MNT incluyen criterios bacteriológicos, clínicos y radiológicos; los dos últimos son muy difíciles de establecer. La definición de infección requiere un mínimo de tres esputos o lavados bronquiales positivos o 2 cultivos positivos con al menos una tinción positiva en los 12 meses previos. Si se obtiene un cultivo positivo para MNT, es obligatorio realizar cultivos seriados para comprobar si se aísla la misma especie de MNT y, en el caso de que sean negativos, prolongarlos al menos durante 1 año para descartar la infección. En bastantes pacientes la colonización es ocasional ya que los cultivos repetidos son negativos, sobre todo en el caso de *M. avium*. La tinción directa es de gran importancia, ya que los pacientes que presentan tinciones positivas cumplen criterios bacteriológicos con mayor frecuencia y se ha apuntado que podrían ser indicativas de infección activa. Asimismo, el aislamiento repetido de MNT se asocia significativamente con enfermedad pulmonar granulomatosa diagnosticada por necropsia en pacientes con FQ. Los pacientes con aislamiento de *M. abscessus* cumplen los criterios bacteriológicos con mayor frecuencia que los pacientes con cultivo positivo del grupo MAC. En aproximadamente dos tercios de los pacientes con *M. abscessus* se observan alteraciones en la tomografía computarizada y se han descrito con mayor frecuencia casos de enfermedad invasiva mortal. *M. abscessus*, además, puede ser la causa de infección diseminada tras el trasplante pulmonar y la posterior terapia inmunosupresora.

La identificación de las especies es esencial y puede requerir técnicas genéticas. Dentro del grupo MAC se deben utilizar medios de identificación que diferencien las especies *M. avium* de *M. intracellulare*. Las técnicas utilizadas son la hibridación con sondas DNA-RNA (AccuProbe), la amplificación de secuencias genéticas seguidas de hibridación (INNO-LIPA), restricción (PCR-RFLP del gen *hsp65*) o secuenciación genética (PCR+ secuenciación de la subunidad 16S del ARNr o del gen *hsp65*). *M. abscessus* es la más patógena y resistente de las micobacterias de crecimiento rápido. Es esencial diferenciarla de *M. chelonae* ya que el tratamiento en las infecciones por *M. abscessus* es especialmente difícil y puede requerir cirugía en las infecciones localizadas si la función pulmonar es adecuada. Pueden diferenciarse fácilmente por la tolerancia al cloruro sódico o la utilización del citrato, pero puede ser necesaria la amplificación seguida de restricción del gen *hsp65* o secuenciación genética del 16S del ARNr o del gen *hsp65*.

El estudio de la sensibilidad se recomienda sólo en el caso de aislamientos que se consideren clínicamente significativos. En los aislamientos de MAC el tratamiento antibiótico está protocolizado, pero puede ser recomendable el estudio de la sensibilidad a los macrólidos (claritromicina). En el caso de *M. abscessus*, no hay un consenso sobre el tratamiento a utilizar, ya que esta micobacteria es especialmente resistente a numerosos antibióticos y la elección del tratamiento se debe guiar por el valor de las CMI en medio

líquido o, dada la complejidad de estas técnicas, por los resultados obtenidos por la técnica de E-test.

Con respecto a la infección por *M. tuberculosis*, es rara en pacientes con FQ y se encuentran muy pocas referencias en la literatura por lo que es difícil conocer su incidencia. En las series que recogen este dato el porcentaje de *M. tuberculosis* es mucho menor (0–2%) frente al aislamiento de MNT (4–25%). A diferencia de las MNT que se encuentran en el medio ambiente, *M. tuberculosis* se transmite persona a persona y es una seria complicación para el paciente con FQ, sobre todo si se trata de aislados multirresistentes, por lo que es recomendable descartarla rápidamente mediante técnicas de detección e identificación genéticas directas cuando la tinción de la muestra sea positiva.

Aspergillus y hongos levaduriformes

La prevalencia de *Aspergillus* en muestras respiratorias de pacientes con FQ varía desde el 6 al 57% según la edad (suele aparecer durante la adolescencia), el lugar de residencia (afecta más a pacientes del medio rural) o las condiciones climáticas (mayor incidencia en zonas costeras). En aproximadamente el 75% persiste en cultivos sucesivos y su aislamiento normalmente representa colonización pulmonar. En el 2–10% de estos pacientes la principal complicación es la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), una hipersensibilización a los antígenos de *Aspergillus* con estimulación de la respuesta inmunitaria celular y producción de anticuerpos específicos³⁰. La prevalencia es baja en menores de 6 años y es más elevada en los pacientes en peores condiciones clínicas. Las principales manifestaciones de esta enfermedad son respiración sibilante, aparición de infiltrados pulmonares, bronquiectasias y fibrosis.

El diagnóstico clínico de ABPA es difícil en estos pacientes ya que las manifestaciones de la enfermedad no son fáciles de diferenciar de las exacerbaciones agudas que sufren. Tampoco lo es el diagnóstico microbiológico ya que el aislamiento de *Aspergillus* en el esputo no es suficiente para el diagnóstico de ABPA, pero sí se ha demostrado una correlación positiva entre anticuerpos específicos en suero y afectación de la función pulmonar. El tratamiento profiláctico con antibióticos predispone a la colonización por hongos, aunque raramente se han notificado casos de aspergiloma o aspergilosis invasiva en pacientes con FQ, excepto en trasplantados pulmonares. La presencia en el esputo, sobre todo, de la forma mucoide de *P. aeruginosa* puede inhibir el crecimiento de hongos, por lo que se recomienda el uso de medios de cultivo para hongos, como el agar Sabouraud glucosa, suplementados con antimicrobianos, como ciprofloxacino o amikacina. La especie mayoritaria es *Aspergillus fumigatus*, aunque otras especies también se han descrito en una proporción mucho menor. *Scedosporium apiospermum* (3–8,6%) sería el segundo en importancia en algunas series. A diferencia de *Aspergillus*, sus esporas se encuentran raramente en el ambiente y los mecanismos de transmisión y colonización crónica no están claros. Podría estar asociado también a episodios de ABPA, pero la presencia de reacción cruzada con determinados antígenos de *A. fumigatus* hace difícil demostrarlo en los pacientes que presentan anticuerpos frente a *Aspergillus*.

Las levaduras se aíslan con mayor frecuencia, el 75–78% de los pacientes con FQ, y *Candida albicans* es la especie mayoritaria. Se presenta en pacientes que reciben tratamiento prolongado con antibióticos o glucocorticoides y el origen es principalmente endógeno a partir de la propia flora del paciente. Se han notificado casos de colonización por la levadura melaninogénica *Exophiala dermatitis*, y su prevalencia es del 2 al 15% cuando se emplea un medio de cultivo específico (agar eritritol cloranfenicol, ECA) y se

prolonga la incubación hasta 4 semanas. El riesgo de infección por esta levadura en pacientes con FQ está todavía por establecer.

Virus respiratorios y otros patógenos

A pesar del papel central de las infecciones bacterianas, hay otros factores no bacterianos implicados en la progresión de la enfermedad pulmonar en los pacientes con FQ. Durante la última década se ha evaluado en estos pacientes el impacto de las infecciones por virus respiratorio sincitial (VRS), virus de la gripe, adenovirus, virus parainfluenza, rinovirus y, más recientemente, metapneumovirus, pero no por otros virus causales de infecciones respiratorias como coronavirus o bocavirus³¹. También se ha considerado la implicación de bacterias atípicas como *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *Legionella pneumophila*³¹. En general, en el 5–20% de los pacientes con exacerbaciones agudas se puede demostrar una etiología viral o por las bacterias señaladas, frente al 0–5% en pacientes en situación estable. La importancia de estas infecciones en los pacientes con FQ probablemente esté subestimada, ya que en la mayoría de los estudios el diagnóstico fue serológico y adolecen de la falta de técnicas directas y rápidas. Recientemente también se ha señalado a *Pneumocystis jirovecii* como un agente que podría tener un papel relevante en la FQ y cuya importancia estaría infravalorada.

La incidencia de infecciones virales en estos pacientes no es mayor que en la población general y en niños menores de 2 años incluso más baja, debido probablemente a una exposición menor. Sin embargo, la infección respiratoria puede ser mucho más grave con mayor afectación de vías bajas, mayor incidencia de exacerbaciones agudas, hospitalización y deterioro de la función pulmonar. Además, puede predisponer a la infección por bacterias al dañar el epitelio respiratorio y facilitar la adherencia bacteriana. Algunos autores han encontrado asociación con un riesgo mayor de infección por *P. aeruginosa*, o con una afectación mayor, indicada por el aumento en el título de anticuerpos anti-*Pseudomonas*, en los pacientes con infección crónica por este microorganismo. Un mayor número de infecciones virales al año se correlaciona con progresión de la enfermedad pulmonar con disminución del índice de Swachman, (FEV₁) o la capacidad vital forzada (FVC) y se ha demostrado que un número significativo de episodios de exacerbación pulmonar son precedidos por infecciones respiratorias virales.

Tipos de muestras, recogida, transporte y conservación

El lavado broncoalveolar es la muestra considerada de referencia en el estudio microbiológico del paciente con FQ. Sin embargo, el esputo es la más utilizada, por su facilidad de obtención y buena correlación con el lavado broncoalveolar. En los pacientes en quienes no se puede obtener muestras de esputo o en los niños pequeños suele recurrirse a los aspirados bronquiales o a tomas retrofaríngeas. Otras muestras utilizadas son los broncoaspirados y cepillados bronquiales. La recogida de las muestras en estos pacientes debe seguir las consideraciones generales³².

Esputo. Su toma ha de evitar la contaminación con microbiota del tracto respiratorio superior, ha de recogerse en envases estériles y remitirse con la mayor celeridad para su estudio. Si el procesamiento no es inmediato, se recomienda mantener la muestra a 4 °C, ya que aunque a temperatura ambiente la viabilidad de *S. aureus* y *P. aeruginosa* no se ve afectada en las primeras 24–48 h, si bien puede afectar a los recuentos bacterianos. En el caso de *H. influenzae* y *S. pneumoniae* los recuentos disminuyen drásticamente con el tiempo y los cultivos

podrían ser falsamente negativos. Para evitarlo, puede congelarse mejor que mantenerse en refrigeración.

Lavado broncoalveolar. Está recomendado en los pacientes con escasa expectoración, con antibioterapia previa prolongada, en los casos particulares de sospecha de colonización por *B. cepacia*, cuando se vaya a aplicar técnicas de biología molecular o en el seguimiento de los pacientes sometidos a trasplante pulmonar.

Muestras retrofaríngeas. Su valor diagnóstico puede variar dependiendo de la edad del paciente y del patrón de colonización. En el caso de *P. aeruginosa* y en pacientes menores de 5 años el valor predictivo positivo es cercano al 95% y el valor predictivo negativo, del 40%, y son algo inferiores para *S. aureus*. Por el contrario, en pacientes jóvenes sin expectoración el valor predictivo positivo para *P. aeruginosa* es menor (83%) y algo mayor el valor predictivo negativo (70%); los valores correspondientes para *S. aureus* son del 91 y el 80%, respectivamente. Se ha demostrado que el valor diagnóstico aumenta cuando se incrementa el número de tomas orofaríngeas estudiadas.

Valoración y manejo de las muestras en el laboratorio de microbiología

En general, se recurre a la tinción de Gram para valorar la idoneidad del esputo para el cultivo. El cultivo debe realizarse con los esputos que presenten más de 25 leucocitos y menos de 25 células epiteliales por campo microscópico con bajo aumento. En los pacientes con FQ no se considera imprescindible su realización puesto que puede no ser suficientemente ilustrativa de los microorganismos presentes, ya que éstos pueden formar acúmulos en las secreciones (biopelículas), o de las células inflamatorias, que no siempre se distribuyen de forma homogénea. Se estima que con los criterios habituales de valoración de la tinción de Gram, hasta el 40% de las muestras de esputo de los pacientes con FQ serían inadecuadas para el cultivo y, sin embargo, ofrecen resultados valorables.

Las muestras respiratorias de los pacientes con FQ, y en particular los esputos, presentan una elevada consistencia y deben someterse a un proceso de homogeneización antes de proceder a su cultivo. Habitualmente se emplean agentes mucolíticos (N-acetilcisteína) o ditiotreitól. También se ha recomendado emplear una homogeneización mecánica (sonicación suave) o utilizar simplemente suero salino¹⁷.

Procesamiento de las muestras respiratorias para cultivo cuantitativo

Finalidad y justificación del cultivo cuantitativo

El diagnóstico y el seguimiento microbiológico cualitativo y cuantitativo de la colonización-infección de las vías respiratorias son una herramienta clave para el manejo clínico de los pacientes con FQ. Según las últimas recomendaciones de la Fundación Americana de FQ, se deben obtener muestras respiratorias para estudio microbiológico en las siguientes premisas: a) al menos una cada 3 meses en pacientes clínicamente estables y sin exacerbaciones pulmonares; b) durante los cuadros de exacerbación pulmonar; c) en caso de cambio del estado clínico; d) en caso de hospitalización, y e) cuando esté indicado por motivos epidemiológicos. Es particularmente importante realizar un seguimiento continuo a los niños con diagnóstico temprano de FQ que permita detectar la colonización inicial por *P. aeruginosa* y la instauración de tratamientos antimicrobianos agresivos para prevenir la persistencia de la colonización inicial y retrasar la infección crónica¹⁷.

Tabla 1
Medios de cultivo recomendables, condiciones óptimas de incubación y objetivos

Medio de cultivo	Condiciones de incubación	Comentario
Agar sangre	35 °C 48 h o 35 °C 24 h+temperatura ambiente 24 h	Crecimiento de microbiota habitual. Útil para visualizar morfotipos de <i>P. aeruginosa</i> , <i>small colony variants</i> de <i>S. aureus</i> y <i>S. pneumoniae</i> . 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 h, CO ₂	Tiene como objetivo el aislamiento de <i>H. influenzae</i> . Si hay cocolonización por <i>P. aeruginosa</i> , se recomienda incubar en anaerobiosis o sustituir este medio por agar chocolate suplementado con bacitracina y colistina
Agar manitol-sal	35 °C 48 h	Medio selectivo diferencial para <i>S. aureus</i> . En pacientes con colonización crónica por <i>S. aureus</i> resistente a meticilina puede utilizarse, además, una placa con medio específico para su aislamiento (medio cromogénico suplementado con cefoxitina o similares)
Agar de MacConkey	35 °C 48 h o 35 °C 24 h+temperatura ambiente 24 h	Medio selectivo diferencial para bacilos gramnegativos, incluidos <i>P. aeruginosa</i> y otros bacilos gramnegativos no fermentadores
Agar cetrimida	35 °C 48 h o 35 °C 24 h+temperatura ambiente 24 h	Medio selectivo diferencial para <i>P. aeruginosa</i>
BCSA, OFPBL o PC	35 °C hasta 5 días o 35 °C 2 días+30 °C 3 días	Medio selectivo diferencial para <i>B. cepacia complex</i>
Saboraud ± cloranfenicol ± actidiona	35 °C y 30 °C, hasta 4 semanas	Medios selectivos para el crecimiento de hongos
Löwestein Jensen o Coletsos y medios líquidos selectivos de enriquecimiento	35 °C, hasta 4 semanas	Tienen como objetivo el aislamiento de micobacterias. Debe realizarse una descontaminación previa de la muestra

Además de la necesidad de utilizar medios selectivos específicos, otra recomendación particular es realizar siembras cuantitativas que permitan conocer la cantidad de los distintos microorganismos presentes en las secreciones respiratorias, un seguimiento más preciso de la evolución temporal del proceso de colonización crónica y valorar la eficacia de los distintos tratamientos instaurados³³. Además, puede facilitar el aislamiento de patógenos que estén en baja proporción, así como la detección de un mayor número de morfotipos de *P. aeruginosa*. Desde el punto de vista metodológico, la siembra cuantitativa puede realizarse siguiendo los procedimientos convencionales de dilución logarítmica seriada de la muestra seguida de siembra por extensión en los medios indicados, aunque esta labor tediosa puede verse facilitada por el uso de sistemas semiautomáticos de siembra cuantitativa, como los sistemas de siembra en espiral.

Medios de cultivo y condiciones de incubación

El cultivo microbiológico de las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ debe incluir medios generales y selectivos-diferenciales para los patógenos habituales y una incubación algo más prolongada que la que se realiza con las muestras de otros pacientes. Con ello se facilita la recuperación de microorganismos que se encuentren en baja proporción, sobre todo cuando hay una colonización simultánea con *P. aeruginosa*. Se recomienda una incubación de al menos 48 h, las primeras 24 h a 35–37 °C y luego a 30 °C para facilitar el crecimiento de posibles bacilos gramnegativos no fermentadores. En algunos protocolos se recomienda específicamente la incubación de los medios entre 3 y 5 días. En la tabla 1 se indican los medios de cultivos más utilizados, las condiciones óptimas de incubación y su objetivo.

El cultivo de micobacterias requiere la utilización de protocolos y medios específicos y una comunicación expresa al laboratorio de microbiología de esta solicitud para establecer los cultivos y condiciones que aseguren su aislamiento. En todos los casos en que se solicite el cultivo para micobacterias es necesario realizar una baciloscopia mediante tinción de ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen) o de fluorescencia adecuada para estos micro-

organismos (auramina-rodamina). Una tinción positiva no indica la presencia de *M. tuberculosis* ya que, como se indicó con anterioridad, este patógeno es infrecuente en el fibrótico quístico, no así las micobacterias atípicas. La frecuente presencia de *P. aeruginosa* en los esputos de estos pacientes requiere una descontaminación eficiente antes de su cultivo.

Los medios de cultivo empleados para los hongos no difieren de los utilizados habitualmente para muestras en las que se sospeche la presencia de estos microorganismos (tabla 1). Se ha recomendado la adición de gentamicina, amikacina o ciprofloxacino para inhibir la fuerte carga bacteriana que puede dificultar su crecimiento.

Consideraciones generales para la identificación de los agentes etiológicos en el contexto de la fibrosis quística

En términos generales, para identificar los agentes etiológicos implicados pueden seguirse los procedimientos empleados habitualmente en cualquier otro proceso infeccioso, aunque es importante tener en cuenta una serie de consideraciones específicas.

La identificación de *S. aureus* mediante las pruebas tradicionales de la coagulasa o la DNasa no presenta mayores problemas en el contexto de la FQ, aunque las morfologías coloniales atípicas (pequeño tamaño, no hemolíticas, no pigmentadas) de los mutantes SCV auxotróficos para timidina, típicos de esta enfermedad, pueden dificultar su reconocimiento en los medios de cultivo.

P. aeruginosa es, en principio, fácilmente reconocible en el laboratorio. No obstante, en los pacientes con FQ es muy frecuente encontrar múltiples morfologías coloniales atípicas entre las que cabe destacar las colonias mucoides o las SCV³³. Otras morfologías coloniales frecuentes en la FQ son los morfotipos metálico y el rugoso. Además, es frecuente encontrar cepas no pigmentadas, carentes del pigmento verde característico; en otras ocasiones presentan otros diferentes, como ocurre en las cepas de pigmentación marrón, hiperproductoras de piomelanina³³. Asimismo, la identificación basada en pruebas bioquímicas mediante galerías

comerciales, como el API 20NE o las incluidas en los sistemas comerciales de microdilución para la identificación y el estudio de sensibilidad (MicroScan, Wider, Vitek, etc.), resulta a menudo dificultosa, principalmente debido al frecuentemente lento crecimiento en medio líquido de estas cepas, así como a su muchas veces disminuida capacidad de asimilación de los sustratos incluidos.

Teniendo en cuenta que *B. cepacia* es altamente transmisible, resistente a muchos antimicrobianos y puede conllevar un mal pronóstico, es importante usar métodos adecuados para su detección e identificación³². *B. cepacia*, especialmente cuando se obtiene de muestras respiratorias de pacientes con FQ, puede necesitar 3 días de incubación antes de que se vean las colonias en el medio selectivo. Las colonias en agar sangre o en los medios selectivos son lisas y ligeramente levantadas y, ocasionalmente, mucoides. Las colonias en MacConkey se ponen de rosa oscuro a rojo debido a la oxidación de lactosa en incubaciones prolongadas (4 a 7 días). La mayoría de los aislamientos son no pigmentados, pero en medios con hierro, como TSI, muchas cepas producen un pigmento amarillo brillante. Además, las colonias de *B. cepacia* tienen un olor característico. La mayoría de las cepas del complejo *B. cepacia* oxidan la sacarosa, el adonitol o ambos, mientras que *R. pickettii* no oxida ninguno de los dos. La mayoría de *B. cepacia* son lisina descarboxilasa positiva, mientras que no lo son *R. pickettii*, *B. gladioli* o *Pandoraea* spp. *B. gladioli* no oxida la lactosa, la maltosa y la sacarosa. Sin embargo, algunas *B. cepacia* de la variedad genómica III (*B. cenocepacia*) tampoco acidifican estos azúcares.

Los sistemas de identificación comerciales no son capaces de diferenciar entre las diferentes especies dentro del complejo y a menudo fallan en separar *B. cepacia complex* de otras especies o géneros relacionados como *B. gladioli*, *R. pickettii*, *R. mannitolilytica* y *Pandoraea* spp.³³. En los estudios que han comparado diferentes sistemas comerciales, el API 20NE parece ser el mejor sistema comercial para identificar *B. cepacia complex*. Los sistemas automatizados como Vitek o MicroScan no son seguros para identificar estas bacterias. Se han usado diferentes métodos para identificar las variedades genómicas dentro del género *Burkholderia*. Las pruebas fenotípicas pueden ser capaces de diferenciar *B. multivorans* y *B. stabilis*. Entre las especies dentro del complejo hay algunas características que pueden ayudar a la identificación. Por ejemplo, *B. multivorans*, *B. stabilis* y *B. dolosa* no son capaces de oxidar la sacarosa. *B. stabilis* es ornitina descarboxilasa positiva, mientras que las otras dos son negativas. *B. multivorans* y *B. dolosa* se diferencian en la lisina descarboxilasa, pero es positiva en sólo el 53% de *B. multivorans*.

En cualquier caso, frecuentemente es difícil diferenciar estas especies mediante técnicas convencionales y se requiere la utilización de técnicas moleculares, descritas en apartados posteriores.

Estudio de la sensibilidad a los antibióticos

Pseudomonas aeruginosa

La periodicidad recomendada para la realización de estudios de sensibilidad a los antibióticos de las cepas de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ es esencialmente la misma que la recomendada para la obtención de muestras respiratorias. En términos generales, la sensibilidad de los aislados procedentes de las exacerbaciones pulmonares suele coincidir con aquella obtenida en los últimos cultivos realizados en situación basal; por lo tanto, se puede utilizar estos datos para establecer las pautas empíricas iniciales. Debido a que las diferentes variantes fenotípicas de *P. aeruginosa* frecuentemente presentan distintos patrones de

resistencia a los antibióticos, debe estudiarse la sensibilidad de todos los morfotipos detectados en los cultivos.

Respecto a las técnicas que se debe emplear, se consideran de referencia la dilución en agar y la microdilución, según las directrices del CLSI. Los sistemas comerciales de microdilución han logrado, en general, resultados poco satisfactorios, con altas tasas de errores muy graves (falsa sensibilidad), y por lo tanto no se recomienda utilizarlos³⁴. Por el contrario, tanto la difusión con discos como el Etest (qué además permite determinar el valor preciso de CMI) han obtenido resultados satisfactorios en comparación con las técnicas de referencia, por esto la Fundación Americana de FQ recomienda enérgicamente su empleo como técnica sistemática en detrimento de los sistemas comerciales de microdilución. El Etest, además, permite determinar la CMI de tobramicina en un amplio intervalo de concentraciones y, por tanto, aplicar los dos puntos de corte propuestos para este antibiótico: el recomendado por el CLSI para administración por vía sistémica (resistente $\geq 16 \mu\text{g/ml}$) y el recomendado recientemente para administración por vía inhalatoria (resistente $\geq 128 \mu\text{g/ml}$)³⁵. Independientemente de la técnica utilizada para el estudio de la sensibilidad, debe prolongarse la incubación de las placas al menos hasta 24 h completas, y en los casos de variantes de lento crecimiento pueden ser necesarias hasta 48 h de incubación. Es asimismo recomendable el uso de densidades bacterianas más elevadas para el estudio de las cepas mucosas (1 McFarland en lugar del 0,5 convencional), ya que el número de células viables, a igual densidad, es menor en estas cepas por la gran cantidad de alginato producido.

Finalmente, tanto la difusión con discos como el Etest, al contrario que la microdilución, permiten la detección de cepas hipermutadoras mediante la documentación de las subpoblaciones de mutantes resistentes (SMR) características de este tipo de cepas^{33,36}. Según estudios previos, la presencia de SMR para al menos 3 de los antibióticos probados (ceftazidima, imipenem, meropenem, ciprofloxacino y tobramicina) puede utilizarse como criterio en la identificación de este tipo de cepas. La detección de cepas hipermutadoras puede ser de utilidad para el manejo clínico de la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*, ya que, como se ha comentado anteriormente, estas cepas son capaces de desarrollar resistencia rápidamente a la mayoría de los antibióticos y, por lo tanto, siempre se debe utilizar terapia combinada para su tratamiento.

Debido a la frecuente presencia de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes e incluso panresistentes en el contexto de la FQ, en ocasiones puede ser necesario recurrir al estudio de la actividad de combinaciones de antibióticos (estudios de sinergia) para la elección del tratamiento más adecuado. La técnica de referencia, aunque tediosa, es la microdilución en tablero de ajedrez. También se han evaluado técnicas basadas en el Etest, con resultados aceptables y, por lo tanto, aparentemente aplicables en la práctica habitual por su relativa sencillez. Otra técnica, utilizada actualmente en centros de referencia en Estados Unidos, determina la actividad bactericida de combinaciones de dos o más antibióticos (técnica denominada MCBT de las siglas inglesas *multiple-combination bactericidal antibiotic testing*). No obstante, su uso no mejoró la respuesta clínica en comparación con la elección de antimicrobianos basada en los estudios de sensibilidad convencionales, por lo que no se recomienda su utilización de forma sistemática, aunque puede resultar útil para casos particulares de infección por cepas multirresistentes o panresistentes¹⁷.

Otros microorganismos

Sin ánimo de pretender realizar una revisión exhaustiva de las técnicas, condiciones y connotaciones, más adecuadas para el

estudio de la sensibilidad a los antibióticos de todos y cada uno de los patógenos potencialmente causantes de colonización-infección respiratoria crónica en los pacientes con FQ, este apartado se limitará a reseñar los aspectos diferenciales o de particular relevancia en el contexto de esta enfermedad.

Para el estudio de la sensibilidad a antibióticos de *S. aureus* de FQ pueden seguirse los procedimientos convencionales utilizados en otros tipos de infecciones. Cabe destacar, no obstante, la creciente relevancia del SARM en el contexto de FQ y, por lo tanto, la importancia de su correcta detección. Tanto el disco de cefoxitina, la siembra en medio de cribado con oxacilina como la aglutinación en látex para la detección de la PBP2a o la detección por PCR del gen *mecA* resultan adecuados para este propósito. La detección de la resistencia a meticilina por las técnicas basadas en el cultivo del microorganismo puede ser más compleja en los mutantes SCV, por lo tanto, es especialmente recomendable en estos casos la detección directa de la PBP2a o del gen *mecA*.

Respecto al estudio de la sensibilidad a antibióticos de *H. influenzae*, cabe destacar dos aspectos diferenciales característicos de las cepas obtenidas de pacientes con FQ. En primer lugar es importante tener en cuenta la relativamente alta prevalencia (>5%), al menos en nuestro medio, de cepas BLNAR. Por tanto, la evaluación de la resistencia a betalactámicos en este microorganismo no debe basarse únicamente en la detección de la producción de betalactamasa (estrategia recomendada en procedimientos de otros países); debe estudiarse la sensibilidad a ampicilina, preferiblemente por técnicas que permitan determinar la CMI, como la microdilución o el Etest. Otro aspecto relevante y característico de las cepas procedentes de pacientes con FQ es la alta prevalencia (que puede llegar hasta el 20%) de aislados resistentes (CMI > 1 µg/ml) a fluoroquinolonas, hecho extremadamente infrecuente fuera del contexto de esta enfermedad¹⁹. Es recomendable la determinación de la CMI (Etest o microdilución) para ciprofloxacino u otras fluoroquinolonas o la detección de la posible pérdida de sensibilidad a las fluoroquinolonas con un disco de ácido nalidíxico.

Hasta la fecha no hay recomendaciones específicas en cuanto al método más adecuado para el estudio de la sensibilidad a antibióticos de *B. cepacia complex*, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* u otros bacilos gramnegativos no fermentadores en el contexto de la FQ y, por lo tanto, debe seguirse la metodología habitualmente utilizada en cada laboratorio (difusión con discos, Etest o microdilución). Es importante considerar que estos microorganismos se caracterizan por presentar de forma natural resistencia a muchos de los antibióticos convencionalmente utilizados para el tratamiento de las infecciones por bacilos gramnegativos, y que esta resistencia es todavía mucho mayor en el contexto de la FQ. En la mayoría de los casos presentarán resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes (todavía presentan cierta actividad frente a *A. xylosoxidans*), aminoglucósidos, ciprofloxacino e incluso a antibióticos de último recurso, como las polimixinas. Por el contrario, frecuentemente pueden ser sensibles a otros antibióticos de uso infrecuente en el tratamiento de las infecciones por bacilos gramnegativos y, generalmente, no evaluados de forma sistemática. Entre ellos, se encuentra el cotrimoxazol, la minociclina o las nuevas fluoroquinolonas; antibióticos que deben ser específicamente estudiados en caso de aislamiento de estos microorganismos. El cotrimoxazol, de hecho, se considera el tratamiento de elección en las infecciones por *S. maltophilia*, aunque la prevalencia de cepas resistentes procedentes de pacientes con FQ está aumentado notablemente. Por el contrario, todas las cepas estudiadas hasta la fecha son uniformemente sensibles a la minociclina. Las nuevas fluoroquinolonas, como el levofloxacino y el moxifloxacino, mejoran sustancialmente la actividad del ciprofloxacino, y

pueden resultar una opción terapéutica de utilidad. Particularmente en el caso de *B. cepacia*, la limitación de las opciones terapéuticas frecuentemente hace necesario recurrir a la búsqueda de sinergias entre 2 o incluso 3 antimicrobianos; diversas combinaciones del meropenem, la tobramicina, el cotrimoxazol, el moxifloxacino o la rifampicina se han utilizado con este propósito.

Estudio de sensibilidad a los antibióticos en biofilm

El estudio estándar de sensibilidad a los antimicrobianos en el laboratorio de microbiología se realiza con un inóculo preparado a partir de microorganismos previamente crecidos hasta fase exponencial o a partir de colonias aisladas en placas de cultivo de 24–48 h (NCCLS-M7A6). Este inóculo se denomina de crecimiento planktónico en contraposición al que se prepara a partir de bacterias desarrolladas en biopelículas o de crecimiento sénil. Este último se asemeja más al crecimiento que se produce en el pulmón del paciente con FQ. De hecho, diferentes autores han señalado que las discrepancias en la respuesta al tratamiento con los resultados que se obtienen en los estudios de sensibilidad podrían deberse a que éstos se realizan con un crecimiento inadecuado de los microorganismos.

Dentro de la complejidad que presenta el estudio de sensibilidad en biopelículas los protocolos que más se han utilizado son los que han derivado del dispositivo descrito por Ceri et al³⁷, conocido como sistema de Calgary. El crecimiento de las bacterias se realiza en placas de microtitulación, idénticas a las que se utilizan para el estudio de sensibilidad por microdilución, cerradas con unas tapas que contienen púas (o pinchos) que se insertan en cada uno de los pocillos y sobre los que se desarrolla el *biofilm*. Una modificación de este sistema ha sido empleado por Moskowitz et al³⁸ para el estudio de sensibilidad de *P. aeruginosa* procedentes de muestras respiratorias de pacientes con FQ y ha servido también como modelo para *S. pneumoniae*²². Esta modificación permite obtener un parámetro de actividad antimicrobiana, quizá más representativo para el tratamiento de la infección crónica que la propia CMI, denominado concentración inhibitoria de biopelículas (CIB).

Interpretación e información de los cultivos cuantitativos secuenciales

Casi todos los trabajos en los que se ha valorado la utilidad y las recomendaciones para la interpretación de los cultivos microbiológicos se han realizado para *P. aeruginosa*. La utilización de cultivos secuenciales de las secreciones respiratorias en los pacientes con FQ permite conocer el patrón de colonización y definir el estadio de colonización broncopulmonar en el que se encuentra el paciente (primocolonización, colonización intermitente, colonización crónica) y confirmar, desde el punto de vista microbiológico, la presencia de exacerbaciones. Asimismo, la realización de recuentos bacterianos en el cultivo facilita la medición de la respuesta al tratamiento en los pacientes con colonización crónica y documenta las exacerbaciones. Aunque hay controversias al respecto, el incremento de los recuentos bacterianos y el aumento del número de morfotipos de *P. aeruginosa* se han relacionado con un deterioro de la función pulmonar. También se ha evidenciado en los pacientes con colonización por *S. maltophilia*. En la tabla 2 se recogen, de manera sintética, las definiciones realizadas por el Grupo Español de Consenso del Tratamiento Antimicrobiano en el Paciente con Fibrosis Quística y los criterios microbiológicos establecidos en la colonización-infección pulmonar por *P. aeruginosa*³⁹. Su objetivo es la

Tabla 2
Estadios de infección-colonización por *P. aeruginosa* y criterios microbiológicos de valoración

Estadio de infección-colonización	Criterios microbiológico	Criterios clínicos	Comentarios
Colonización inicial (primocolonización o colonización pionera)	Detección del primer cultivo positivo de <i>P. aeruginosa</i> en el árbol bronquial	No aparecen manifestaciones clínicas ni respuesta inmunológica específica	Suelen ser cepas con 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 período de 6 meses a partir de la colonización inicial, de un cultivo positivo para <i>P. aeruginosa</i> de entre, al menos, 3 cultivos separados, al menos, 1 mes entre ellos	No hay signos de infección o respuesta inmunológica patente	Pueden aparecer cepas con colonias mucosas y 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	Suelen ser cepas con colonias no mucosas, con escasa diversidad de morfotipos y sensibles a antimicrobianos. En pacientes sin estudio microbiológico puede utilizarse como criterio diagnóstico la aparición o el 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 período de 6 meses, de al menos 3 cultivos positivos para <i>P. aeruginosa</i> en muestras separadas entre sí, al menos, 1 mes	Ausencia de nuevos signos clínicos de infección pero con respuesta inmunitaria consistente con la presencia de <i>P. aeruginosa</i>	Suele producirse por cepas con colonias mucosas y otros morfotipos coloniales. Es el patrón habitual en períodos 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 inmunitaria 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

clasificación de los pacientes para establecer pautas de tratamiento antimicrobiano. Por el momento no hay criterios publicados que definan los estadios de colonización por otros patógenos.

La identificación correcta de *B. cepacia* probablemente es uno de los aspectos más relevantes en el control microbiológico de los pacientes con FQ. El fallo en el reconocimiento de este importante patógeno puede tener notables consecuencias en la evolución clínica del paciente, mientras que la falsa identificación de otros microorganismos, como *B. cepacia*, conlleva también un elevado impacto médico, social y psicológico. Asimismo, la importancia clínica de las diferentes variedades genómicas no es la misma por la que se debería realizar la identificación de la variedad dentro del complejo *B. cepacia*. Cuando se aísla este patógeno, debe informarse lo más rápidamente posible, y confirmar el resultado en un centro de referencia. Asimismo, se deben aplicar medidas de control estrictas, particularmente es necesario separar a estos pacientes de otros no colonizados para evitar la transmisión cruzada. Se recomienda también mantener separados entre sí a los pacientes colonizados por *B. cepacia*, para evitar la transmisión de cepas particularmente virulentas.

El informe del laboratorio de microbiología para las muestras respiratorias de pacientes con FQ debe incluir la identificación y el recuento (logaritmo de ufc/ml de esputo) de todos los microorganismos potencialmente patógenos presentes, y su antibiograma correspondiente. En el caso de *P. aeruginosa*, se debe especificar el número de morfotipos distintos presentes y se debe incluir un antibiograma para cada uno de ellos. Particularmente, debe especificarse, en su caso, la presencia de cepas con morfotipo mucoso. En el informe del antibiograma se debe aplicar, como en cualquier otro tipo de infección, los puntos de corte establecidos para la administración de los antibióticos por vía sistémica;

también es recomendable aplicar puntos de corte específicos para la vía inhalada. Actualmente, sólo hay recomendaciones específicas para la tobramicina, que es el antibiótico más frecuentemente usado como terapia de mantenimiento por vía inhalatoria en los pacientes con FQ³⁵. Los puntos de corte establecidos indican considerar como potencialmente tratables por esta vía las cepas cuya CMI de tobramicina sea $\leq 64 \mu\text{g/ml}$ (puntos de corte convencionales del CLSI $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ sensible).

En función de la experiencia de cada centro, los estudios de sensibilidad convencionales pueden completarse con la determinación de otros parámetros descritos en apartados anteriores: determinación de la concentración inhibitoria de biopelículas (CIB) y la concentración inhibitoria de mutantes (CPM). Si bien estos parámetros no pueden sustituir, hoy por hoy, a la CMI clásica, pueden aportar información complementaria útil en la selección de los regímenes antibióticos más adecuados para el tratamiento de la infección crónica por *P. aeruginosa*. De igual forma, sería recomendable realizar e informar los estudios de sinergia en las cepas multirresistentes.

Asimismo, en función de la experiencia de cada centro, debe valorarse la detección de cepas hipermutadoras y, en su caso, informar de su aislamiento y añadir en las observaciones del informe una llamada a la necesidad de utilizar combinaciones de antibióticos para su tratamiento debido al elevado riesgo de desarrollar resistencia. Una de las cuestiones más relevantes que surgen al examinar los antibiogramas de las cepas hipermutadoras es cómo interpretar e informar los resultados de sensibilidad por la frecuente presencia de SMR. La aproximación más conservadora sería considerar las subpoblaciones resistentes y leer las CMI (Etest) o diámetros de los halos de inhibición (difusión con discos) que producen una completa inhibición del crecimiento. El problema de esta consideración es que en muchos

casos informaríamos la cepa como resistente a todos los antibióticos (incluso aunque no presente mecanismos de resistencia adquiridos) y, por lo tanto, no habría ninguna opción terapéutica disponible. Sin embargo, los estudios de sinergia demuestran que las SMR desaparecen cuando se utilizan combinaciones de antibióticos con distinto mecanismo de resistencia. Resulta importante distinguir la verdadera resistencia de la debida a la presencia de SMR producida por la propia frecuencia de mutación incrementada, ya que al contrario de lo que ocurre con el primer tipo de resistencia, el segundo podría ser potencialmente combatido con combinaciones de antibióticos. En este sentido, recientemente se ha propuesto una alternativa para la interpretación de los antibiogramas (difusión con discos y Etest) de las cepas hipermutadoras^{33,36}: a) leer las CMI (o diámetros de los halos de inhibición) de la población general y aplicar los puntos de corte definidos para las categorías de sensibilidad (S, I, R), y b) examinar la presencia de SMR y leer las CMI o diámetros de los halos de inhibición producidos por el crecimiento de éstas y aplicar los puntos de corte definidos para las categorías de sensibilidad (S, I, R). La lectura definitiva de las SMR puede requerir 12–24 h adicionales de incubación en las cepas de lento crecimiento. Informar de los antibióticos para los cuales la población general es sensible, pero que contiene SMR que supera los puntos de corte como «resistente, pero potencialmente activo para su uso en terapia combinada».

Técnicas rápidas de diagnóstico

Detección de *P. aeruginosa* y otros patógenos en muestras respiratorias por métodos moleculares

El cultivo es la técnica utilizada habitualmente para detección de *P. aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos. Sin embargo, en ocasiones el cultivo es negativo (especialmente en pacientes con tratamiento antimicrobiano o con baja carga bacteriana) o se requieren varios días para llegar a la identificación. Por eso, cada vez es más frecuente la utilización de técnicas moleculares que permiten un diagnóstico más rápido y con menor límite de detección⁴⁰.

La amplificación mediante PCR de los genes ribosomales, la posterior secuenciación y comparación con bases de datos, permite identificar prácticamente todos los microorganismos y ha permitido identificar nuevas especies. En los últimos años se ha utilizado con éxito la técnica de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) para detección de los principales patógenos en pacientes con FQ (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *B. cepacia*, *Burkholderia* spp. y *S. maltophilia*). La técnica permite obtener resultados en pocas horas y se ha descrito muy buena especificidad, pero sensibilidad del 90%, comparada con el cultivo, ya que requiere alta densidad de colonización para dar un resultado positivo.

Las técnicas de PCR utilizadas para detectar *P. aeruginosa* en esputo de pacientes con FQ presentan, en general, alta sensibilidad (del 93 al 100% según los *primers* que se utilicen)⁴⁰. Entre los genes utilizados como diana encontramos el ARNr 16S, *oprI* y *oprL*, *algD* o el gen de la exotoxina A (ETA). Uno de los genes más utilizados, *oprI*, está muy conservado entre los diferentes miembros de *Pseudomonas*, y el gen *oprL* es específico de *P. aeruginosa*, incluidas las colonias no pigmentadas y las mucoides. Por lo tanto, es posible realizar una PCR múltiple que detectará *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas* en la misma reacción. La técnica aplicada a muestras clínicas muestra una alta sensibilidad, ya que es capaz de detectar 100 ufc/ml. Estas técnicas

permiten, además, detectar colonización con *P. aeruginosa* una media de 4,5 meses antes que el cultivo.

Las técnicas moleculares también se han utilizado con éxito para detectar *B. cepacia complex* a partir de muestras respiratorias de pacientes con FQ, mediante diferentes *primers* diseñados para amplificar el gen *recA*, regiones conservadas del gen 16S ARNr, o la región espaciadora 16S a 23S^{41,42}. Los primeros estudios se realizaron con los *primers* para el 16S ARNr; sin embargo, estos *primers* estaban diseñados frente a una cepa de *B. cepacia* de la variedad genómica I y actualmente se sabe que tienen baja especificidad para *B. multivorans* y *B. vietnamiensis* y, además, pueden tener reacción cruzada con otras bacterias distintas de *B. cepacia complex*. Los *primers* de la región espaciadora 16S-23S permiten identificar sólo 3 variedades genómicas (*B. cepacia*, *B. cenocepacia* y *B. stabilis*) por lo que no son útiles para detectar todas las cepas del complejo. Los *primers* del gen *recA* permiten detectar bacterias del complejo *B. cepacia* con alta especificidad y posteriormente identifican las diferentes variedades genómicas por RFLP⁴¹. De hecho, los casos descritos de PCR negativa y cultivo positivo para *B. cepacia* resultaron ser cepas de *Burkholderia* pero no del complejo *cepacia*. El método es poco sensible, pues necesita 10⁶ ufc/g de esputo para dar un resultado positivo, debido a que se amplifica un fragmento relativamente grande (para poder obtener patrones diferentes de digestión) y en el genoma de *B. cepacia* hay una única copia del gen *recA*. El límite de detección es más bajo cuando se usan los *primers* de la región espaciadora del 16S-23S, debido a que en el genoma hay múltiples copias del operón ARNr. Sin embargo, a pesar de que el límite de detección por gramo de esputo es alto, los resultados clínicos son excelentes y muestra una muy buena correlación con los datos obtenidos por cultivo.

Técnicas para el estudio directo de la sensibilidad y la resistencia a los antibióticos

En los últimos años cada vez cobra más interés el desarrollo de procedimientos que permitan conocer la sensibilidad a antibióticos directamente en la siembra primaria. La principal motivación para esta aproximación reside en que con los procedimientos convencionales hay un retraso importante en la obtención de los resultados, no menos de 2 ó 3 días después de la toma de muestra en el mejor de los casos, lo que limita enormemente el impacto positivo de la terapia dirigida, particularmente en las infecciones graves de rápida evolución. Según estudios recientes, la realización de un antibiograma por Etest directamente de las muestras respiratorias de los pacientes con neumonía relacionada con ventilación mecánica ofrece resultados en 18–24 h prácticamente concordantes en su totalidad con el antibiograma convencional. En primera instancia cabría suponer que la disminución del tiempo necesario para la obtención de los resultados no debe ser aparentemente una prioridad imperiosa en el contexto de la colonización-infección crónica en pacientes con FQ, y que por tanto no estaría justificada esta aproximación. No obstante, existe otra connotación que quizá abogue a favor del estudio directo de sensibilidad: la gran heterogeneidad poblacional en las infecciones crónicas. Esta marcada heterogeneidad obliga al estudio individual de cada uno de los morfotipos presentes en las muestras (ya que frecuentemente presentan diferente sensibilidad), con el aumento notable del coste y la complejidad del procedimiento; es más, ello no garantiza la detección de poblaciones resistentes, ya que colonias pertenecientes al mismo morfotipo también podrían presentar distinto perfil de resistencia a antimicrobianos. Principalmente son dos las técnicas propuestas para este fin, el Etest directo y la siembra en medios con antibióticos⁴³. Si bien

sus potenciales prestaciones son prometedoras, no están suficientemente validadas por estudios comparativos y por eso ninguna de ellas puede sustituir actualmente al procedimiento convencional, aunque pueden ofrecer resultados complementarios de utilidad.

Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales

Técnicas moleculares para la identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores

Como se ha comentado anteriormente, la identificación de *B. cepacia* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores requiere de técnicas moleculares, ya que los métodos fenotípicos no son suficientemente fiables y se puede realizar identificación incorrecta de bacterias con alta trascendencia clínica, como *P. aeruginosa* o, sobre todo, *B. cepacia*.

La técnica molecular definitiva es la secuenciación, que permite identificar cualquier bacteria comparando la secuencia en la base de datos o incluso permite identificar bacterias nuevas. La comparación de la secuencia del gen ARNr 16S se ha usado como prueba de referencia en estudios filogenéticos de bacterias; sin embargo, la resolución puede ser demasiado baja para distinguir especies muy relacionadas. También se ha utilizado la secuencia del gen *gyrB* como complementaria a la del ARNr para identificar algunas bacterias como *Pandoraea* spp.

Si la secuenciación no está disponible, se puede realizar el patrón de restricción del fragmento amplificado (PCR-RFLP) o el polimorfismo de la conformación de la cadena simple (SSCP), que puede ser analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante o electroforesis capilar. La técnica de ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*), en la que se amplifica el gen y posteriormente se realiza una digestión con enzimas de restricción, ha demostrado ser una alternativa a la secuenciación para diferenciar, por ejemplo, *Inquilinus* spp. o *Pandoraea* spp. de otros bacilos gramnegativos no fermentadores.

La técnica de AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) convencional puede ser útil para identificar *B. cepacia*, pero es técnicamente compleja. La PCR en tiempo real está accesible en muchos laboratorios clínicos, pero no es útil para detectar cualquier microorganismo presente, sino que se utiliza para identificar un género o especie según la amplificación de un gen específico⁴². Se han estudiado diferentes dianas y la mejor identificación, especialmente en la identificación de *P. aeruginosa* atípicas, se consigue cuando se detectan varios genes simultáneamente.

La determinación de las variedades genómicas de *B. cepacia* se basa en un estudio taxonómico complejo que incluye pruebas fenotípicas, como el perfil de proteínas totales, y genotípicas, como hibridación ADN-ADN. Recientemente, se están utilizando con éxito las pruebas basadas en PCR para identificar las variedades genómicas, principalmente basadas en el gen ARNr 16S o en el *recA*^{41,42}. La amplificación del gen ARNr 16S, y posterior análisis mediante secuenciación o con enzimas de restricción, tiene un uso limitado para diferenciar las variedades genómicas, ya que no presenta suficiente variabilidad. El estudio del gen *recA* se puede afrontar desde diferentes estrategias que dependerán de la disposición de medios en cada centro: a) amplificación del gen con *primers* específicos que permite identificar un aislamiento como perteneciente al complejo *B. cepacia*; b) digestión del fragmento amplificado con *HaeIII* y con *MnII* que permite clasificarlos dentro de las principales variedades; c) PCR específica de cada variedad de forma individualizada, y d) secuenciación del fragmento amplificado, que permite la identificación y la clasificación precisa.

Técnicas de epidemiología molecular para el seguimiento de la colonización-infección broncopulmonar crónica

La aplicación de las técnicas de tipificación molecular puede contribuir de manera notable a la optimización del seguimiento microbiológico de la infección-colonización crónica por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ. La electroforesis en campo pulsado (ECP), como para la mayoría de los microorganismos, es la técnica de referencia, aunque aquellas basadas en la PCR (REP, AP, ERIC o RAPD, entre otras) pueden resultar, por su rapidez y sencillez, más fácilmente adaptables al trabajo sistemático del laboratorio de microbiología.

Una de las principales aportaciones de las técnicas de tipificación molecular es su utilidad para el propio diagnóstico de la infección-colonización crónica. Como se ha comentado en apartados anteriores, los primeros estadios del proceso suelen cursar con aislamiento esporádico o intermitente de *P. aeruginosa*; la tipificación molecular puede permitir determinar si realmente se trata ya de una colonización crónica, todavía con baja carga bacteriana, o si por el contrario se trata únicamente de colonizaciones esporádicas por cepas ambientales diferentes. De igual forma, las técnicas de tipificación molecular pueden resultar de gran utilidad para la evaluación de la eficacia de los tratamientos erradicadores iniciales. Si bien es factible conseguir en estos primeros estadios la negativización de los cultivos por un periodo más o menos prolongado, es frecuente que al cabo de los meses se vuelva a documentar cultivos positivos: la tipificación molecular nos permitirá determinar si nos enfrentamos a una falsa erradicación (la cepa original persistió en densidades por debajo del umbral de detección) o si, por el contrario, nos encontramos ante una nueva colonización-infección por otra cepa diferente (y por lo tanto el tratamiento erradicador fue efectivo)³⁹.

En los últimos años se ha documentado la diseminación epidémica de cepas concretas de *P. aeruginosa* entre los pacientes con FQ⁷. El primer clon epidémico fue originalmente descrito en 1995 en Liverpool (LES, *Liverpool epidemic strain*) y actualmente se encuentra diseminado por todo el Reino Unido. De igual forma, se ha descrito una notable transmisión de clones epidémicos entre pacientes con FQ en Australia. Finalmente, en un estudio reciente se documenta la transmisión cruzada entre pacientes con FQ de dos clones concretos mayoritarios durante más de dos décadas en Dinamarca; estos clones aparentemente estarían adaptados no sólo para producir infección crónica, sino también para transmitirse de forma eficiente entre los pacientes con FQ. Frecuentemente, además, estos clones epidémicos son resistentes a múltiples antibióticos y su aislamiento conlleva un peor pronóstico de la infección crónica. Por lo tanto, es recomendable mantener una vigilancia activa para la detección y la contención de clones potencialmente epidémicos.

Diagnóstico serológico en el contexto de la FQ

La diferenciación entre colonización, infección y enfermedad no es fácil de establecer en el caso de algunos de los microorganismos oportunistas que afectan de forma crónica a los pacientes con FQ. En determinados casos es importante detectar cuanto antes la infección inicial ya que el tratamiento antibiótico precoz es útil para evitar el establecimiento de la infección crónica antes de que sea imposible erradicarla. En otros casos, la distinción entre colonización e infección, aunque difícil, puede establecerse según criterios basados en la frecuencia o la persistencia de su aislamiento. El diagnóstico de enfermedad activa o deterioro pulmonar atribuible a ellos es muy difícil en estos pacientes basado en criterios clínicos, funcionales o

radiológicos porque prácticamente todos los pacientes con FQ presentan alteraciones debidas a la propia enfermedad. En este contexto, el estudio de la respuesta de anticuerpos específicos contra microorganismos, como *Aspergillus*, *P. aeruginosa* o MNT, es un complemento útil para la detección precoz de la colonización, la diferenciación entre infección y enfermedad activa, como marcador pronóstico, para la toma de decisiones terapéuticas o, en algún caso, para el seguimiento de la respuesta al tratamiento³³. En el caso de *Aspergillus*, la presencia de anticuerpos específicos es un criterio fundamental, aunque no suficiente, para confirmar o excluir el diagnóstico de ABPA³⁰. Estudios longitudinales de pacientes con FQ desde el nacimiento han mostrado que la detección de anticuerpos específicos anti-*P. aeruginosa* puede preceder entre 3 y 24 meses al primer aislamiento por cultivo. Una vez aislada por primera vez, los títulos elevados o su aumento pueden preceder hasta en 3 años a la instauración de la infección crónica⁴⁴. La detección de anticuerpos contra *P. aeruginosa* sería útil para el diagnóstico de la infección inicial por este microorganismo, sobre todo cuando no es posible la obtención de muestras adecuadas para cultivo, principalmente en niños muy pequeños⁴⁵.

Bibliografía

- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:918–51.
- Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry Annual Report. Bethesda, Maryland; 2005.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:194–222.
- Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2003;9:486–91.
- Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4:35–51.
- Cantón R, Oliver A, Baquero F. Microbiología de las vías respiratorias en la fibrosis quística. En: Dapena Fernández FJ, editor. *Fibrosis quística: atención integral. Manejo clínico y puesta al día.* Granada: Alhulila; 1998. p. 105–58.
- Govan JR, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol.* 2007;2:153–64.
- Oliver A, Mena A, Maciá MD. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity: from acute to chronic infections. En: Baquero F, Nombela C, Cassell GH, Gutiérrez-Fuentes JA, editors. *Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens.* Washington: ASM Press; 2007.
- Parad RB, Gerard CJ, Zurakowski D, Nichols DP, Pier GB. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect Immun.* 1999;67:4744–50.
- Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:8487–92.
- Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* 2000;288:1251–3.
- Maciá MD, Borrell N, Segura M, Gómez G, Pérez JL, Oliver A. Efficacy and potential for resistance selection of anti-pseudomonal treatments in a mouse model of lung infection by hypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:975–83.
- Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. 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.
- Jarry TM, Cheung AL. *Staphylococcus aureus* escapes more efficiently from the phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. *Infect Immun.* 2006;74:2568–77.
- Prunier AL, Malbrun B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclerc R. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis.* 2003;187:1709–16.
- Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1998;177:1023–9.
- Gillian PH, Kiska DL, Appleman MD. Cumitech 43, Cystic fibrosis microbiology. Appleman MD, coordinador, editor. American Society for Microbiology; 2006.
- Möller LVM, Regelink AG, Grasselie H, Dankert-Roelse E, Dankert J, Van Alphen L. Multiple *Haemophilus influenzae* strains and strain variants coexist in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1995;172:1388–92.
- 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;42:1450–9.
- Pérez-Vázquez M, Román F, García-Cobos S, Campos J. Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae* is associated with hypermutability. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1566–9.
- Del Campo R, Morosini MI, De la Pedrosa EG, Fenoll A, Muñoz-Almagro C, Maiz L, et al. Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2207–14.
- García-Castillo M, Morosini MI, Valverde A, Almaraz F, Baquero F, Cantón R, 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.
- LiPuma JJ. *Burkholderia cepacia* complex: a contraindication to lung transplantation in cystic fibrosis? *Transpl Infect Dis.* 2001;3:149–60.
- Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:57–71.
- Beringer PM, Appleman MD. Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr Opin Pulm Med.* 2000;6:545–50.
- Valdezate S, Vindel A, Maiz L, Baquero F, Escobar H, Cantón R. Persistence and variability of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients, Madrid, 1991–1998. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:113–22.
- Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Faiz AR, Lee J, Zhang Y, et al. Nontuberculous Mycobacteria. I: Multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:828–34.
- Pierre-Audigier C, Ferroni A, Sermet-Gaudelus IS, Le Bourgeois M, Offredo C, Vu-Thien H, et al. Age-related prevalence and distribution of nontuberculous mycobacteria species among patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3467–70.
- Oliver A, Maiz L, Cantón R, Escobar H, Baquero F, Gómez-Mampaso E. Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1298–303.
- Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary *Aspergilliosis* in cystic fibrosis—state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis.* 2003;37(Suppl 3):S225–64.
- Olesen HV, Nielsen LP, Schiøtz PO. Viral and atypical bacterial infections in the outpatients pediatric cystic fibrosis clinic. *Pediatric Pulmonology.* 2006;41:1197–204.
- Meseguer MA, Cacho JB, Oliver A, Puig de la Bellacasa J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:430–6.
- Alarcón T, Caballero E, Cantón R, Oliver A. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica* n.º 25. 2.ª ed. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Disponible en: http://www.seimc.org/documentos/index.asp?apV=documentos&apV1=documentos&apn0=documentos_index_txt.htm.
- Burns JL, Saiman L, Whittier S, Krzewinska J, Liu Z, Larone D, et al. Comparison of two commercial systems (vitek and MicroScan-Walkaway) for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001;39:257–60.
- Morosini MI, García-Castillo M, Loza E, Pérez-Vázquez M, Baquero F, Cantón R. Breakpoints for predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to inhaled tobramycin in cystic fibrosis patients: use of high-range Etest strips. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4480–5.
- Maciá MD, Borrell N, Pérez JL, Oliver A. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2665–72.
- 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.
- 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.
- Cantón R, Cobos N, De Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, et al. 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.
- Tramper-Stranders GA, Van der Ent CK, Wolfs TFW. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibr.* 2005;4:37–43.
- Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, et al. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3165–73.

42. Vonberg R, HauBler S, Vandamme P, Steinmetz I. Identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens by rapid-cycle PCR with fluorescent hybridization probes. *J Med Microbiol.* 2006;55:721–7.
43. Perry JD, Laine L, Hughes S, Nicholson A, Galloway A, Gould FK. Recovery of antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from sputa of cystic fibrosis patients by culture on selective media. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:1057–61.
44. West ESH, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, et al. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. Early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA.* 2002;287:2958–67.
45. Ratjen F, Walter H, Haug M, Meisner C, Grasemann H, Doring G. Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Pediatric Pulmonol.* 2007;42:249–55.

Original articles

Anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody detection in patients with bronchiectasis without cystic fibrosis

E Caballero, M-E Drobnic, M-T Pérez, J-M Manresa, A Ferrer, R Orriols

Abstract

Background—*Pseudomonas aeruginosa* is a frequent cause of infection in patients with bronchiectasis. Differentiation between non-infected patients and those with different degrees of *P aeruginosa* infection could influence the management and prognosis of these patients. The diagnostic usefulness of serum IgG antibodies against *P aeruginosa* outer membrane proteins was determined in patients with bronchiectasis without cystic fibrosis.

Methods—Fifty six patients were classified according to sputum culture into three groups: group A (n=18) with no *P aeruginosa* in any sample; group B (n=18) with *P aeruginosa* alternating with other microorganisms; and group C (n=20) with *P aeruginosa* in all sputum samples. Each patient had at least three sputum cultures in the 6 months prior to serum collection. Detection of antibodies was performed by Western blot and their presence against 20 protein bands (10–121 kd) was assessed.

Results—Antibodies to more than four bands in total or to five individual bands (36, 26, 22, 20 or 18 kd) differentiated group B from group A, while antibodies to a total of more than eight bands or to 10 individual bands (104, 69, 63, 56, 50, 44, 30, 25, 22, 13 kd) differentiated group C from group B. When discordant results between the total number of bands and the frequency of *P aeruginosa* isolation were obtained, the follow up of patients suggested that the former, in most cases, predicted chronic *P aeruginosa* colonisation. **Conclusion**—In patients with bronchiectasis the degree of *P aeruginosa* infection can be determined by the number and type of outer membrane protein bands indicating which serum antibodies are present.

(Thorax 2001;56:669–674)

the disease. Later, *Pseudomonas aeruginosa* may be detected, alternating with other microorganisms but, as the disease progresses, *P aeruginosa* displaces the other organisms and appears more consistently in the sputum.^{2,3} It has been observed in patients with cystic fibrosis that *P aeruginosa* infection of the lower respiratory tract may be associated with a progressive deterioration in pulmonary function.^{4,5} Early detection of initial or intermittent *P aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis may be important as certain antibiotic treatments have proved useful in preventing or delaying chronic *P aeruginosa* infection.⁶

It is possible to monitor the specific immune response to *P aeruginosa* by antibody detection since it has been proved in patients with cystic fibrosis that the response is greater as the disease evolves or when mucoid phenotype *P aeruginosa* is isolated.⁷ In these patients the production of high titres of specific antibodies to *P aeruginosa* appears to be an important factor in them becoming chronically infected with *P aeruginosa*. These antibodies are not only incapable of eradicating the bacteria, but form immune complexes that activate inflammation mediators with subsequent destruction of lung parenchyma tissue and progressive deterioration in pulmonary function.^{2,7,8} It has therefore been suggested that the detection of specific anti-*P aeruginosa* antibodies in patients with cystic fibrosis correlates with an aggressive course of the chronic infection and worse prognosis of the disease.⁹

Similar events appear to occur in some bronchiectasis patients without cystic fibrosis. The sequence of microorganisms isolated from the bronchial tree is similar and, although *P aeruginosa* infection in these patients could simply be a marker of severe disease, it has been associated with greater disease progression and worse lung function.^{10–12} Nevertheless, cystic fibrosis is a disease with specific characteristics and it is unknown whether the antibody response to *P aeruginosa* in bronchiectasis patients without cystic fibrosis follows the same pattern.

The aim of this study was to establish the presence of specific antibodies to *P aeruginosa* and to assess whether these antibodies permit differentiation of different infectious states in patients with bronchiectasis not caused by cystic fibrosis.

Servei de
Microbiologia,
Hospital Universitari
Vall d'Hebron, 08035
Barcelona, Spain
E Caballero
M-T Pérez
J-M Manresa
A Ferrer

Servei de
Pneumologia, Hospital
Universitari Vall
d'Hebron
M-E Drobnic
R Orriols

Correspondence to:
Dr R Orriols
rorriols@hg.vhebron.es

Received 8 November 2000
Returned to authors
14 February 2001
Revised version received
15 May 2001
Accepted for publication
21 June 2001

Keywords: antibodies; *Pseudomonas aeruginosa*; bronchiectasis

Patients with bronchiectasis are predisposed to persistent lower respiratory tract infections.¹ *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae* may be isolated in the sputum in early or less advanced stages of

Methods

PATIENTS

Fifty six patients with bronchiectasis diagnosed by clinical history and high resolution chest CT scanning were included in the study. Two sweat tests were normal in all cases. Blood samples were all negative for 31 cystic fibrosis mutations including AF508, G542X and N1303K, the most frequent mutations in Spain.¹³ The cause of the bronchiectasis was not identified in 33 cases, 16 patients had a history of pulmonary tuberculosis, six had an immunodeficiency, and one patient had Young's syndrome. All had attended the pneumology outpatient clinic during the previous year and were clinically stable on inclusion in the study. At least three sputum cultures, separated by a minimum of 1 month, were taken in the 6 months before the start of the study.

Patients were classified into three groups according to microbiological criteria: group A (n=18) from whom *P aeruginosa* was not isolated in any of the sputum samples; group B (n=18) from whom *P aeruginosa* was isolated alternating with positive cultures for other microorganisms; and group C (n=20) from whom *P aeruginosa* was isolated in all sputum samples.

Sex, age, time with previous positive cultures to *P aeruginosa*, number of admissions in the year prior to the study, and pulmonary function spirometric parameters were evaluated in each patient. The results of sputum cultures performed in the 24 months after inclusion in the study were also collected.

BLOOD AND SPUTUM SAMPLE PROCESSING

A blood sample for later antibody study was obtained from each patient. Microbiological study of sputum was performed if the latter fulfilled determined quality criteria on microscopic examination.¹⁴ The study included Gram smear, conventional culture in blood agar, McConkey and Sabouraud media, and quantitative culture in chocolate agar. *P aeruginosa* was identified by conventional microbiological methods¹⁵ and the AMS Vitek (Bio Mérieux, Marey-Etoile, France) system.

STRAINS AND CULTURE CONDITIONS

Several *P aeruginosa* strains isolated from sputum samples of patients with chronic *P aeruginosa* infection were selected according to their morphological characteristics (mucoid phenotype in blood and McConkey agar). As all had a very similar outer membrane protein pattern on Western blot analysis, the *P aeruginosa* strain used for detection of anti-*P aeruginosa* outer membrane protein specific antibodies was selected for its better capacity to grow in the absence of iron.¹⁶ The strain was cultured at 37°C under shaking in a chemically defined medium (CDM) containing 40 mM (NH₄)₂SO₄, 3.2 mM K₂HPO₄·3H₂O, 0.62 mM KCl, 0.5 mM NaCl, 0.4 mM MgSO₄·7H₂O, and 50 mM 3-(N-morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid (MOPSO).¹⁷ The pH of the medium was adjusted to 7.8 with NaOH. Following sterilisation of the medium and before inoculating the strain, 40 mM glucose

were added as the only source of carbon and energy.

OUTER MEMBRANE PROTEIN PREPARATION

Outer membrane protein preparation was carried out according to the method of Filip *et al.*¹⁸ Bacteria grown at 37°C in CDM were collected by centrifugation and resuspended in sterile physiological serum. The humid weight was calculated and they were resuspended in distilled water at 10 ml for each 0.5 g and broken by sonication in an ice bath (20 kHz for 2 minutes, 5 cycles). Whole cells were eliminated by centrifugation at 5000g for 20 minutes. Sarcosyl (N-lauroyl-sarcosine Na) was added up to a final concentration of 2% to solubilise the inner membranes and incubated at room temperature for 30 minutes. Outer membranes were collected by centrifugation at 38 000g for 1 hour at 4°C. The pellets with outer membrane proteins were resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) and stored frozen at -70°C until used. The total protein concentration of the preparation was calculated by the benzethonium chloride method with a BM/Hitachi 917 automatic analyser (Boehringer-Mannheim Corporation, Indianapolis, IN, USA) following the method of Luxton *et al.*¹⁹

WESTERN BLOT

Separation of outer membrane proteins was achieved using vertical electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel in a 4–20% gradient according to the Laemmli method²⁰ with the Protean II system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The quantity of outer membrane proteins was 120 µg per gel diluted up to a final volume of 250 µl with 50 mM Tris-HCl (pH 6.8). This preparation was mixed with 250 µl of sample buffer (10% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.003% bromophenol blue in Tris-HCl pH 6.8 (50 mM)) and heated at 90°C for 10 minutes before being inoculated into the gel. Following electrophoresis, transfer to nitrocellulose was made in accordance with the Towbin method²¹ for 3.5 hours at 100 volts plus 15 hours at 35 volts. The nitrocellulose membrane containing outer membrane proteins was cut into strips 3 mm in width which were stored at 4°C until use.

The Immun-blot Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) with anti-human IgG conjugated with alkaline phosphatase was used for detection of type IgG immune response. The whole process was carried out at room temperature and in an orbital shaker. All serum samples were assayed at a dilution of 1/100. Briefly, the nitrocellulose strips were blocked for 1 hour with 5% skimmed milk in Tris-NaCl (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5) and washed once with Tris-NaCl with 0.05% Tween 20. Serum samples diluted in Tris-NaCl with 0.05% Tween 20 plus 2% skimmed milk were incubated with the nitrocellulose strips for 2 hours, washed three times with Tris-NaCl with 0.05% Tween 20, incubated for 1 hour with human anti-IgG conjugated with alkaline phosphatase diluted 1/3000 in Tris-NaCl with 0.05% Tween 20 plus 2% skimmed milk, and then incubated for

Table 1 Characteristics of the three groups of patients with non-CF bronchiectasis

Patient characteristics	Group A (n=18)	Group B (n=18)	Group C (n=20)	p value
M/F	9/9	12/6	10/10	NS
Age (years)*	58.9 (11.86)	67.4 (10.9)	64.5 (11.9)	NS
FEV ₁ (ml)**	1.6 (1.0–2.1)	1.1 (0.8–1.6)	0.9 (0.6–1.1)	0.015
FEV ₁ (% predicted)*	62.9 (21.3)	52.7 (22.2)	38.8 (13.8)	0.001
FVC (ml)**	2.35 (1.6–3.1)	1.65 (1.4–2.2)	1.65 (1.0–2.3)	NS
FVC (% predicted)*	69.2 (17.8)	56.0 (20.7)	50.2 (16.8)	0.009
Admissions during year before study**	0 (0–1)	1 (1–2)	2 (1–3)	<0.001
Previous time with <i>P aeruginosa</i> (months)*	–	15 (21)	32 (20)	0.0045

CF = cystic fibrosis; FEV₁ = forced expiratory volume in 1 second; FVC = forced vital capacity; NS = not significant.

*Mean (SD).

**Median (quartiles 1–3).

30 minutes with the substrate (nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4 chloro-3 indoyl phosphate) prepared following the manufacturer's instructions.

CALCULATION OF MOLECULAR WEIGHT

The molecular weight of the individual protein bands detected by Western blot was estimated by comparison with a pattern of proteins of known molecular weight (6.5–200 kd) (Bio-Rad Laboratories) which were subjected to electrophoresis and transfer under identical conditions to outer membrane protein preparation.

ASSESSMENT OF WESTERN BLOT TECHNIQUE

To assess the total number of outer membrane protein bands and the presence of each individual band found by our Western blot technique, serum samples from 30 healthy individuals of similar age and sex distribution to the patients with bronchiectasis were assayed.

STATISTICAL ANALYSIS

Qualitative variables are presented as absolute values and corresponding percentages, and quantitative variables are presented as mean (SD) values or median (quartiles 1–3) when normality criteria were not met. Qualitative variables were compared using the Pearson's χ^2 test or Fisher's exact test according to application conditions. The Student's *t* test was used to compare quantitative variables between two groups or the Mann-Whitney U test when normality criteria were not met. Multiple comparisons between three or more groups were made using analysis of variance or the Kruskal-Wallis test if the data were not normally distributed. The level of statistical significance in all cases

was ≤ 0.05 . Optimum cut off points selected were those with the highest efficiency (percentage of well classified individuals), and the area under the ROC curve (ROCarea) with its 95% confidence interval (95% CI) is provided to describe their discrimination power.

Results

PATIENT CHARACTERISTICS

Characteristics of the three groups of patients with bronchiectasis are shown in table 1. Significant differences were found in respiratory functional parameters, absolute and percentage predicted forced expiratory volume in 1 second, and percentage predicted forced vital capacity between the three patient groups and in the number of hospital admissions during the year prior to inclusion in the study.

MOLECULAR WEIGHT OF OUTER MEMBRANE PROTEIN BANDS DETECTED BY WESTERN BLOT

The presence of antibodies to 20 bands of *P aeruginosa* outer membrane proteins was studied by Western blot. The bands were denominated by their estimated molecular weight with a mean of three values of 121, 104, 94, 89, 81, 69, 63, 56, 50, 47, 44, 36, 30, 26, 25, 22, 20, 18, 13, and 10 kd.

ASSESSMENT OF WESTERN BLOT TECHNIQUE

In one of 30 healthy individuals (16 men, mean (SD) age 62 (13) years) the median (quartiles 1–3) total number of bands detected by Western blot was 1 (0.0–1.0). When each of the individual outer membrane protein bands detected was assessed, antibodies to the 56 kd band were found in nine (30%) and antibodies to the 10 kd band in six (20%) of these healthy individuals. Fewer than 10% had antibodies to any of the 12 outer membrane proteins (94, 81, 69, 47, 36, 30, 26, 25, 22, 20, 18, and 16 kd bands). No healthy individuals had antibodies against six outer membrane proteins (121, 104, 89, 63, 50 and 44 kd).

ASSOCIATION BETWEEN TOTAL NUMBER OF BANDS DETECTED BY WESTERN BLOT AND FREQUENCY OF *P AERUGINOSA* ISOLATION

The presence of *P aeruginosa* anti-outer membrane protein antibodies assessed by the total number of bands in each group of bronchiectasis patients is shown in fig 1 and table 2. No significant differences were found in the total number of bands between those without previous isolation of *P aeruginosa* (group A) and the healthy individuals, but significant differences

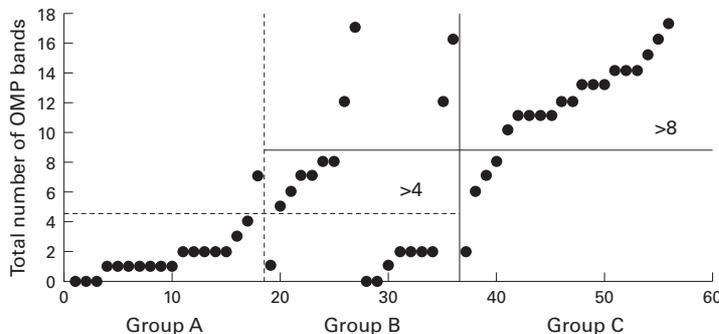


Figure 1 Total number of outer membrane protein bands (OMP) detected by Western blot analysis. Each patient in the three groups of patients with bronchiectasis (A=18, B=18, C=20) is represented by the total number of OMP bands to which antibodies were detected.

Table 2 Total number of *P aeruginosa* outer membrane protein bands to which antibodies were detected by Western blot

Patients	Total number of bands
Group A (n=18)	1 (1.0–2.0)
Group B (n=18)	5.5 (1.7–9.0)
Group C (n=20)	12 (10.2–14.0)
p value	<0.0001

Values are medians (quartiles 1–3).

were found between the three groups of bronchiectasis patients (table 2). The Kruskal-Wallis test for multiple comparison analysis of the three patient groups indicated that the differences observed were significant between group C and group A ($p < 0.05$) and between group C and group B ($p < 0.05$).

All the possible cut off points, using the total number of outer membrane protein bands detected, were assessed to differentiate between the patient groups. The best cut off point between groups A and B was >4 bands (efficiency 75%, ROCarea 0.75, 95% CI 0.58 to 0.88). Similarly, the optimum cut off point obtained to differentiate between groups C and B was >8 bands (efficiency 75%, ROCarea 0.79, 95% CI 0.63 to 0.91).

In group A 17 of the 18 patients (94.4%) had ≤ 4 bands and, with the exception of two in whom a first *P aeruginosa* isolation was obtained 18 and 20 months later, the rest (15/18) remained free from *P aeruginosa* infection in the follow up period. *P aeruginosa* was later isolated from the only patient in this group who had >4 bands (7 bands).

Eight of the 18 patients in group B had ≤ 4 bands and in seven of these *P aeruginosa* had been isolated for the first time during the month before the serum sample was taken. With the exception of one case, *P aeruginosa* was not isolated during follow up. In six of the 18 patients in this group 5–8 bands were detected, but *P aeruginosa* was isolated in only one. In the four remaining patients >8 bands were detected and *P aeruginosa* was isolated from three of these during the follow up period.

In 16 of the 20 patients in group C >8 bands were detected and on only three occasions was *P aeruginosa* not isolated in the follow up period (3, 6 and 12 months of control). In three patients 6, 7, and 8 bands were detected, respectively, although *P aeruginosa* continued

to be isolated chronically. In one case the number of bands was ≤ 4 but *P aeruginosa* continued to be isolated chronically.

ASSOCIATION BETWEEN INDIVIDUAL BANDS DETECTED BY WESTERN BLOT AND FREQUENCY OF *P AERUGINOSA* ISOLATION

The presence of antibodies against individual bands of *P aeruginosa* outer membrane proteins and their possible association with the three patient groups was assessed (table 3). No significant differences were found in the presence of individual bands between patients in group A and the healthy individuals. The presence of antibodies against five individual bands (36, 26, 22, 20 and 18 kd) of the 20 detected by Western blot was significant when patients of group A were compared with those of group B (table 3). When patients in groups B and C were compared the difference in the presence of antibodies to 10 bands (104, 69, 63, 56, 50, 44, 30, 25, 22, and 13 kd) was significant (table 3).

Discussion

It has been suggested that the specific immune response may identify patients with cystic fibrosis infected with *P aeruginosa*.²² Although this response would also be expected to be useful in evaluating non-cystic fibrosis patients with bronchiectasis infected with *P aeruginosa*, no study investigating this possibility has been found in the literature. In this study a correlation was found between the frequency of *P aeruginosa* isolation in sputum and anti-*P aeruginosa* antibodies detected by Western blot, which suggests that this technique could identify and distinguish between different degrees of *P aeruginosa* infection in these patients.

Various types of antigens have been used by different authors to ascertain the presence of specific antibodies to *P aeruginosa* in patients with cystic fibrosis.^{22–26} We chose to use outer membrane proteins as antigens as they have some advantages, the most important of which are their conservation among the 17 *P aeruginosa* serotypes,²⁷ their proven antigenicity,^{28, 29} and the fact that they present no cross reaction with other Gram negative bacilli.²⁷

To obtain the outer membrane protein preparation we assessed several strains isolated

Table 3 Results of Western blot by individual *P aeruginosa* outer membrane protein bands to which antibodies were detected

<i>P aeruginosa</i> OMP band (kd) *	Number (%) of individuals with antibodies			p value	
	Group A (n=18)	Group B (n=18)	Group C (n=20)	Group B v A	Group C v B
104	0 (0.0)	3 (16.7)	10 (50.0)	NS	0.031
69	1 (5.6)	4 (22.2)	13 (65.0)	NS	0.008
63	0 (0.0)	3 (16.7)	15 (75.0)	NS	<0.001
56	7 (38.9)	10 (55.6)	18 (90.0)	NS	0.041
50	5 (27.8)	8 (44.4)	19 (95.0)	NS	0.001
44	1 (5.6)	2 (11.1)	9 (45.0)	NS	0.021
36	3 (16.7)	12 (66.7)	18 (90.0)	0.002	NS
30	1 (5.6)	5 (27.8)	13 (65.0)	NS	0.022
26	0 (0.0)	9 (50.0)	12 (60.0)	0.002	NS
25	0 (0.0)	2 (11.1)	13 (65.0)	NS	0.001
22	0 (0.0)	5 (27.8)	13 (65.0)	0.045	0.022
20	0 (0.0)	8 (44.4)	6 (30.0)	0.005	NS
18	4 (22.2)	12 (66.7)	18 (90.0)	0.007	NS
13	5 (27.8)	4 (22.2)	12 (60.0)	NS	0.019

OMP = outer membrane protein; NS = not significant.

*Only the OMP bands with significant differences between groups are shown.

from sputum samples of our patients chronically infected by mucoid *P aeruginosa*, as did Shand *et al.*¹⁷ Since all the strains had a very similar pattern of outer membrane protein on Western blot analysis, as expected by their conservation among *P aeruginosa* serotypes,²⁷ the *P aeruginosa* strain used for detection of anti-*P aeruginosa* outer membrane protein specific antibodies was finally selected for its better capacity to grow in the absence of iron as this is necessary to guarantee the production of iron regulated outer membrane proteins.¹⁶

Although the classic technique for demonstrating the presence of these antibodies has been crossed immunoelectrophoresis,²² immunoenzymatic techniques such as enzyme-linked immunosorbent assay²³⁻²⁶ or Western blot analysis^{17 28 30} have proved to be much more sensitive; the latter permits simultaneous study of antibodies against different antigenic components. Our Western blot technique even introduces some improvements compared with that used by Shand *et al.*¹⁷ since, with the use of gels in a gradient of 4–20%, better separation and transfer of outer membrane proteins to nitrocellulose membrane are achieved, thereby permitting better assessment of high molecular weight outer membrane proteins.³¹

As reported in other studies,^{10 12} the presence of *P aeruginosa* in the sputum of non-cystic fibrosis patients with bronchiectasis is associated with greater deterioration in pulmonary function and a higher number of hospital admissions. We do not believe that this implies a bias which invalidates the results since it is clear that the detection of antibodies against *P aeruginosa* must be attributed directly to the immunological stimulus resulting from the presence of this bacterium in the bronchial tree.

With respect to the total number of bands found, our results indicate that the presence of antibodies against more than four bands permits differentiation between patients with bronchiectasis from whom *P aeruginosa* was not isolated (group A) and those with intermittent isolation (group B). The presence of antibodies to some protein bands in patients in group A might be explained by the presence in their serum of antibodies that may cross react with some of the outer membrane proteins studied, in most cases (38.9%) against the 56 kd protein. Similarly, 30% of individuals in the healthy group showed reactivity against the same protein. In the only patient in group A who had more than four bands, *P aeruginosa* was isolated chronically during follow up. In fact, using an enzyme-linked immunosorbent assay, Brett *et al.*³² found that an increase in the titre of IgG against *P aeruginosa* surface antigens above the control range preceded isolation of *P aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in whom it had not been isolated previously. In the present study we also found that the presence of antibodies against more than eight bands permits the diagnosis of chronic isolation of *P aeruginosa* in bronchiectasis patients. The distribution of the results in group B may be explained by the difficulty in

interpreting microbiological results when isolation of *P aeruginosa* is not consistent. However, *P aeruginosa* was not isolated again in most of the patients in group B with four bands or less, while in those with more than eight bands *P aeruginosa* continued to be isolated during the follow up period. Thus, in the former patients an absent or low antibody response could suggest a transient infection with response at the bronchial level but not sufficiently intense at the systemic level, while in the latter group an increased response would suggest an early response or failure in *P aeruginosa* recovery owing to an inadequate sample or low bacteria counts in chronically infected patients. Høiby *et al.*²² observed a positive correlation between the severity of *P aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis and the number of precipitating bands detected by crossed immunoelectrophoresis using soluble antigen. The number of precipitating bands has even been used together with sputum microbiology to identify patients with chronic *P aeruginosa* infection.²² Shand *et al.*,³⁰ using the same soluble antigen and Western blot technique, found highly significant differences in the number and intensity of blotted bands between serum samples taken before and after a diagnosis of *P aeruginosa* lung infection. Hancock *et al.*,²⁸ using Western blot and outer membrane protein preparation (as in our study), found a correlation in patients with cystic fibrosis between the presence of antibodies against *P aeruginosa* outer membrane proteins and *P aeruginosa* isolation for more than one year.

Shand *et al.*¹⁷ studied the chronological appearance of antibodies against outer membrane proteins including those dependent on iron. The earliest antibodies appeared against outer membrane protein H1 (21 kd) and were generally accompanied by antibodies against G (20–25 kd) and/or I (15–16 kd). Antibodies against iron-dependent outer membrane proteins (71, 74, 76, and 83 kd) appeared late and only in seriously ill patients; thus, it is likely that these proteins are not expressed until the infection is very advanced. Although we did not identify the outer membrane protein bands of *P aeruginosa* or perform sequential analysis of patients, we did observe that antibodies against 36 kd and/or 18 kd proteins were probably the most precocious since, though rarely found in group A patients, they did appear in most of the patients in groups B and C. Antibodies to the 69, 63, 30, 25, and 22 kd proteins differentiated well between patients in groups C and B and therefore probably appear later. Our high molecular weight proteins (81–121 kd) probably corresponded to iron-dependent outer membrane proteins and, as observed by Shand *et al.*,¹⁷ appeared much later only in some patients in group C.

As in cystic fibrosis, determination of anti-*P aeruginosa* antibodies could also be useful in patients with bronchiectasis without cystic fibrosis. It would be particularly useful in patients who have difficulty in producing good quality samples for microbiological sputum culture and in those whose previous clinical

and microbiological history is unknown. Furthermore, it would contribute additional information to that obtained from microbiological study of sputum samples.

The authors wish to thank Christine O'Hara for useful manuscript corrections, Rosa Lloria for secretarial assistance, and Maria Teresa Barbero for technical assistance.

E Caballero and M-E Drobnic both contributed equally to the study.

- 1 Barker AF, Bardana EJ. Bronchiectasis: update of an orphan disease. *Am Rev Respir Dis* 1988;**137**:969-78.
- 2 Koch C, Hoiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 1993;**341**:1065-9.
- 3 Fiel SB. Clinical management of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Lancet* 1993;**341**:1070-4.
- 4 Packe GE, Hodson ME. Changes in spirometry during consecutive admissions for infective pulmonary exacerbations in adolescent and adult cystic fibrosis. *Respir Med* 1992;**86**:45-8.
- 5 Moss RB. Cystic fibrosis: Pathogenesis, pulmonary infection and treatment. *Clin Infect Dis* 1995;**21**:839-51.
- 6 Valerius NH, Koch C, Hoiby N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 1991;**338**:725-6.
- 7 Pier GB. Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J Infect Dis* 1985;**151**:575-80.
- 8 Hoiby N, Schiøtz PO. Immune complex-mediated tissue damage in the lungs of cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Acta Paediatr Scand* 1982;**301**(Suppl):63-73.
- 9 Hoiby N, Koch C. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and its management. *Thorax* 1990;**45**:881-4.
- 10 Wilson CB, Jones PW, O'Leary CJ, et al. Effect of sputum bacteriology on the quality of life of patients with bronchiectasis. *Eur Respir J* 1997;**10**:1754-60.
- 11 Wells A, Desai S, Whetton C, et al. The isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from sputum in idiopathic bronchiectasis: an association with extensive disease and severe airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1993;**147**:A645.
- 12 Evans SA, Turner SM, Bosch BJ, et al. Lung function in bronchiectasis: the influence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J* 1996;**9**:1601-4.
- 13 Casals T, Nunes V, Palacio A, et al. Cystic fibrosis in Spain: high frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. *Hum Genet* 1993;**91**:66-70.
- 14 Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clinic Proc* 1975;**50**:339-44.
- 15 Barrow GI, Feltham RKA. Characters of Gram-negative bacteria. In: *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press, 1993: 94-150.
- 16 Neilands JB. Microbial envelope proteins related to iron. *Ann Rev Microbiol* 1982;**36**:285-309.
- 17 Shand GH, Pedersen SS, Brown MR, et al. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins and iron-regulated membrane proteins at different stages of chronic cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol* 1991;**34**:203-12.
- 18 Filip C, Fletcher G, Wulff JL, et al. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J Bacteriol* 1973;**115**:717-22.
- 19 Luxton RW, Patel P, Keir G, et al. A micro-method for measuring total protein in cerebrospinal fluid by using benzethonium chloride in microtiter plate wells. *Clin Chem* 1989;**35**:1731-4.
- 20 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**:680-5.
- 21 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;**76**:4350-4.
- 22 Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Section C* 1977;**262**(Suppl):3-96.
- 23 Pedersen SS, Espersen F, Hoiby N. Diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1987;**25**:1830-6.
- 24 Brett MM, Ghoneim ATM, Littlewood JM, et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* cell surface antigens in sera of patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol* 1986;**39**:1124-9.
- 25 Fomsgaard A, Dinesen B, Shand GH, et al. Anti-lipopolysaccharide antibodies and differential diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1989;**27**:1222-9.
- 26 Brauner A, Cryz SJ, Granström M, et al. Immunoglobulin G antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and exotoxin A in patients with cystic fibrosis or bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;**12**:430-6.
- 27 Mutharia LM, Nicas TI, Hancock REW. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *J Infect Dis* 1982;**146**:770-9.
- 28 Hancock REW, Mouat ECA, Speert DP. Quantitation and identification of antibodies to outer-membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* in sera of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1984;**149**:220-6.
- 29 Aronoff S C, Stern C. Serum IgG antibody to outer membrane antigens of *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1988;**157**:934-40.
- 30 Shand GH, Pedersen SS, Tilling R, et al. Use of immunoblot detection of serum antibodies in the diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 1988;**27**:169-77.
- 31 Hames BD. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D, eds. *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1990:1-147.
- 32 Brett MM, Simmonds EJ, Ghoneim ATM, et al. The value of serum IgG titres against *Pseudomonas aeruginosa* in the management of early pseudomonal infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1992;**67**:1086-8.



Anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody detection in patients with bronchiectasis without cystic fibrosis

E Caballero, M-E Drobnic, M-T Pérez, et al.

Thorax 2001 56: 669-674

doi: 10.1136/thorax.56.9.669

Updated information and services can be found at:

<http://thorax.bmj.com/content/56/9/669.full.html>

References

These include:

This article cites 29 articles, 16 of which can be accessed free at:

<http://thorax.bmj.com/content/56/9/669.full.html#ref-list-1>

Article cited in:

<http://thorax.bmj.com/content/56/9/669.full.html#related-urls>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Cystic fibrosis](#) (429 articles)

Notes

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>