



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

COLONIZACIÓN FÚNGICA EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA SOMETIDOS A TRASPLANTE PULMONAR

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Medicina por

Maria de la Luz Calero Bernal

Sevilla, Mayo de 2017

COLONIZACIÓN FÚNGICA EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA SOMETIDOS A TRASPLANTE PULMONAR

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Medicina por
Maria de la Luz Calero Bernal

Sevilla, Mayo de 2017



Enrique José Calderón Sandubete
Doctor en Medicina

Directores

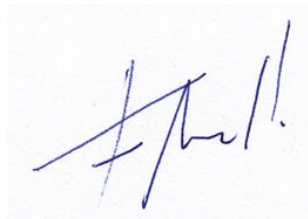


Maria Esther Quintana Gallego
Doctora en Medicina



Maria Carmen de la Horra Padilla
Doctora en Farmacia

Tutor



Francisco Murillo Cabezas
Doctor en Medicina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la dedicación y ayuda del equipo de investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío integrado por el grupo de Epidemiología Clínica y Molecular y el laboratorio de investigación en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), por ello agradezco a:

- Dr. Enrique Calderón Sandubete, Dra. Carmen de la Horra Padilla y Dra. Maria Esther Quintana Gallego, directores de esta tesis, por su dedicación y profesionalidad.
- Vicente Friaza Patiño, por su valía profesional y tantas horas de dedicación en el laboratorio.
- Dr. Javier Medrano Ortega y Dr. José Manuel Varela Aguilar, por haberme iniciado en la profesión médica y en el mundo de la investigación, así como por su excelencia profesional y humana.
- Dr. Domingo González Arjona, por su ayuda en el análisis estadístico.

Quiero dar las gracias a los integrantes del servicio de Medicina Interna del Hospital Virgen del Rocío, del que formé parte durante mis cinco años de residente, pues de todos ellos he podido aprender en el quehacer médico y en el personal. Especialmente a Lola González, por su cariño, dedicación y por lo que me ha enseñado con su buen hacer. Asimismo, por los momentos buenos y malos que hemos compartido, a Isa Martín, Rafa Terán, Maite Martínez, Aurora González, Rosa García...

Mis agradecimientos al servicio de Medicina Interna del Hospital San Juan de Dios del Aljarafe, en el que ahora estoy integrada y en especial al Dr. Antonio Fernández-Moyano, pues me está dando la oportunidad de seguir creciendo como internista y animarme en la realización de esta tesis.

A toda mi familia y amigos, pues ellos son el soporte fundamental en mi día a día. A mis padres, a los que debo todo lo que soy, por su cariño y apoyo incondicional para realización de esta tesis y en el camino de la vida. A mi hermano, por ser un ejemplo de esfuerzo y superación. Y especialmente a Domingo, pues no podía haber encontrado mejor compañero de viaje.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	15
1. Características generales de la fibrosis quística	17
2. Epidemiología	19
2.1. Incidencia	19
2.2. Factor edad	19
2.3. Diferencias entre sexos	19
2.4. Dependencia geográfica y ambiental	20
3. Fisiopatología	20
3.1. Mecanismos productores de alteraciones patognomónicas	21
3.2. Mutaciones del gen CFTR	23
3.3. Moduladores de la enfermedad	25
4. Complicaciones infecciosas	26
4.1. Infecciones en pacientes no trasplantados	26
4.1.1. El sinergismo	29
4.1.2. El antagonismo	30
4.1.3. Comportamiento parasitario	31
4.1.4. La interacción hospedador-agente	31
4.2. Infecciones bacterianas en pacientes no trasplantados	33
4.3. Infecciones fúngicas en pacientes no trasplantados	34
4.3.1. <i>Candida</i>	36
4.3.2. <i>Aspergillus</i>	38
4.3.3. <i>Scedosporium/Pseudallescheria</i>	40
4.3.4. <i>Pneumocystis</i>	41
4.4. Infecciones víricas en pacientes no trasplantados	43
4.5. Infecciones en pacientes trasplantados	44
4.6. Infecciones bacterianas en pacientes trasplantados	46
4.7. Infecciones fúngicas en pacientes trasplantados	47
4.7.1. <i>Candida</i>	49
4.7.2. <i>Aspergillus</i>	50
4.7.3. <i>Scedosporium y otras</i>	53
4.7.4. <i>Pneumocystis</i>	54
4.8. Infecciones víricas en pacientes trasplantados	55
5. Técnicas utilizadas para el diagnóstico de las infecciones	57
5.1. Muestras	57
5.2. Metodología	58
5.2.1. Estudio de la microbiota	59
5.2.2. Estudio de la micobiota	64
6. Tratamiento	69
6.1. Tratamiento farmacológico de la fibrosis quística	69
6.1.1. Moduladores del regulador de la conductancia transmembrana en fibrosis quística (CFTR).	69
6.1.2. Agentes osmóticos y mucolíticos	69
6.1.3. Agentes antiinflamatorios	70
6.1.4. Agentes antiinfecciosos	70
6.1.5. Terapia génica	75

6.2.	Tratamiento quirúrgico (Trasplante pulmonar)	76
	JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	83
	HIPÓTESIS DE PARTIDA	87
	OBJETIVOS	91
	MATERIAL Y MÉTODOS	95
1.	Ámbito del estudio	97
2.	Población	97
2.1.	Criterios de inclusión	97
2.2.	Criterios de exclusión	97
2.3.	Selección de los controles	98
2.4.	VARIABLES DE ESTUDIO	98
3.	Método	98
4.	Técnicas de laboratorio	98
4.1.	Obtención y almacenamiento de las muestras	98
4.2.	Extracción de ADN	99
4.3.	Identificación y caracterización molecular de <i>P. jirovecii</i>	99
4.3.1.	Técnicas de amplificación del ADN	99
4.3.2.	Identificación del gen mt LSU rRNA	100
4.3.3.	Identificación de los polimorfismos del gen mt LSU rRNA	102
4.4.	Determinación de la presencia de otros hongos	103
4.5.	Determinación de la presencia de colonización bacteriana	104
4.5.1.	Identificación de <i>P. aeruginosa</i>	104
4.5.2.	Identificación de <i>S. pneumoniae</i>	105
4.6.	Determinación de los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano	105
5.	Controles de calidad	106
6.	Definición de colonización	106
7.	Análisis de datos	106
8.	Aspectos éticos	107
	RESULTADOS	109
1.	Descripción de microorganismos encontrados	111
2.	Controles sin fibrosis quística	113
2.1.	Colonización fúngica en sujetos sin fibrosis quística	113
2.2.	Niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística con colonización fúngica	113
2.3.	Colonización bacteriana en sujetos sin fibrosis quística	114
3.	Pacientes con fibrosis quística	115
3.1.	Colonización fúngica en pacientes con fibrosis quística	115
3.2.	Niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística con colonización fúngica	116
3.3.	Colonización bacteriana en pacientes con fibrosis quística	117
4.	Pacientes trasplantados	118
4.1.	Colonización fúngica en pacientes trasplantados	119
4.2.	Niveles de betaglucano en pacientes trasplantados con colonización fúngica	122
4.3.	Colonización bacteriana en pacientes trasplantados	124
5.	Colonización por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	126
5.1.	En sujetos sin fibrosis quística	126
5.2.	Niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística	126
5.3.	En pacientes con fibrosis quística	127

5.4.	Niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística	128
5.5.	En pacientes trasplantados y sus genotipos	129
5.6.	Niveles de betaglucano en pacientes trasplantados	130
6.	Principales aislamientos y niveles de betaglucano	131
6.1.	En pacientes con fibrosis quística	131
6.2.	En pacientes trasplantados	131
	DISCUSIÓN	133
1.	Descripción de microorganismos encontrados	135
2.	Controles sin fibrosis quística	136
2.1.	Colonización fúngica en sujetos sin fibrosis quística	136
2.2.	Niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística con colonización fúngica	137
2.3.	Colonización bacteriana en sujetos sin fibrosis quística	137
3.	Pacientes con fibrosis quística	138
3.1.	Colonización fúngica en pacientes con fibrosis quística	138
3.2.	Niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística con colonización fúngica	139
3.3.	Colonización bacteriana en pacientes con fibrosis quística	139
4.	Pacientes trasplantados	141
4.1.	Colonización fúngica en pacientes trasplantados	141
4.2.	Niveles de betaglucano en pacientes trasplantados con colonización fúngica	143
4.3.	Colonización bacteriana en pacientes trasplantados	144
5.	Colonización por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	145
5.1.	En sujetos sin fibrosis quística	145
5.2.	Niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística	146
5.3.	En pacientes con fibrosis quística	146
5.4.	Niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística	147
5.5.	En pacientes trasplantados y sus genotipos	148
5.6.	Niveles de betaglucano en pacientes trasplantados	149
6.	Principales aislamientos y niveles de betaglucano	149
6.1.	En pacientes con fibrosis quística	149
6.2.	En pacientes trasplantados	150
7.	Limitaciones	151
8.	Cuestiones abiertas	152
	CONCLUSIONES	153
	RESUMEN - SUMMARY	157
	BIBLIOGRAFÍA	167
	GLOSARIO DE TÉRMINOS	181
	ANEXOS	185

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA FIBROSIS QUÍSTICA.

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en un gen localizado en el cromosoma 7, responsable de la síntesis de un polipéptido de 1480 aminoácidos denominado regulador de la conductancia transmembrana (CFTR) que actúa como canal de cloro en las células de las membranas epiteliales.

La FQ provoca cambios histológicos en los órganos que expresan el gen CFTR y que incluyen células secretoras, senos nasales y paranasales, pulmones, páncreas, hígado y sistema reproductor. Las alteraciones más importantes se observan en las vías aéreas donde se produce una inflamación endobronquial persistente responsable del curso deletéreo de la función respiratoria, y que se observa tanto en pacientes que están clínicamente estables como en recién nacidos (diagnosticados en estudios de cribaje neonatal).

La sospecha clínica de FQ se confirma por la triada diagnóstica (Davis, Drumm *et al.*, 1996): enfermedad pulmonar crónica, una concentración de más de 60 mEq/L⁻¹ de cloro en el sudor y/o insuficiencia pancreática. Aunque se cree que ha estado presente desde hace siglos en la población europea (Dodge, 2015), no es hasta 1930 cuando se hizo la primera descripción como “nueva enfermedad” tras autopsias de niños que presentaban déficits de vitamina A, a la vez que se especuló con la existencia de una base genética (confirmada en 1989). Por ello los progresos sobre el conocimiento de FQ se han realizado basados en los avances de los estudios genéticos y nutricionales.

La FQ es una enfermedad progresiva multisistémica que afecta primero al pulmón, páncreas y sistema gastrointestinal (Tabla nº 1) (Amaral, 2015). La insuficiencia pancreática exocrina conlleva a la oclusión del ducto que se manifiesta con esteatorrea, y posteriormente desemboca en el desarrollo de una diabetes mellitus (DM). La afectación pulmonar constituye la primera causa de morbilidad en estos pacientes. Hace unos años la expectativa de vida estaba en torno a 10 años, actualmente se sitúa en los 40 (Kumar *et al.*, 2014).

Hoy día los programas de cribado prenatal y neonatal en EE.UU hacen que los niños puedan estar diagnosticados antes de tener síntomas respiratorios. Estableciéndose mediante dos tests que demuestren una alta concentración de cloro en el sudor ($> 60 \text{ mEq/L}^{-1}$) aunque para individuos con síntomas sugestivos pero valores intermedios ($30 - 60 \text{ mEq/L}^{-1}$) son necesarias pruebas adicionales, como una biopsia rectal.

Tabla nº 1. Manifestaciones clínicas de la fibrosis quística.

Vías aéreas bajas	Síntomas respiratorios agudos o persistentes Tos crónica y producción de esputo Hiperviscosidad del moco Enfermedad pulmonar obstructiva Neumonía o infecciones pulmonares recurrentes Colonización persistente por patógenos de FQ Bajo rendimiento en las pruebas de función pulmonar Alteraciones crónicas en la radiografía de tórax (bronquiectasias)	Sistema gastrointestinal/ Nutrición	Insuficiencia pancreática con malabsorción / Malnutrición Esteatorrea / heces anormales Íleo meconial / Obstrucción intestinal Prolapso rectal Enfermedad hepatobiliar Pancreatitis recurrente Síndrome de obstrucción intestinal distal
		Glándulas sudoríparas	Alta concentración de cloro en el sudor Ausencia de respuesta β -adrenérgica
Vías aéreas altas	Pólipos nasales y sinusitis Enfermedad senopulmonar supurativa crónica Pansinusitis crónica	Sistema reproductor masculino	Ausencia congénita bilateral / unilateral del conducto deferente Azoospermia obstructiva
		Metabolismo	Hipoproteinemia Déficit de vitaminas liposolubles Síndrome pierdesal con depleción de sal, con o sin alcalosis metabólica

Adaptado de Amaral *et al.* (2015).

2. EPIDEMIOLOGÍA

2.1. Incidencia

Se estima que está en 1 por cada 2500-4000 recién nacidos, con una distribución heterogénea. Afecta a más de 70.000 individuos en el mundo, y en Europa supera los 30.000 (Bobadilla *et al.*, 2002). En el estudio publicado en 2008 sobre la prevalencia de FQ en la Unión Europea, se calculó que la tasa de portadores en Reino Unido era de 4% y en el Norte, Oeste y Norte-oriental europeo del 70% (Farrell, 2008). En EE.UU sigue siendo una de las causas de muerte más frecuente dentro de las enfermedades de base genética (90% de los pacientes) (Davis *et al.*, 1996).

2.2. Factor edad

La supervivencia ha aumentado en los últimos años por lo que el número de adultos con FQ se está incrementando rápidamente, pues la mayoría de los niños alcanzan la edad adulta. En los países en los que se ha desarrollado un buen soporte para estos pacientes, el cómputo de personas afectadas mayores de 18 años es igual o incluso superior al de los enfermos menores de esta edad; la mediana de supervivencia está en torno a los 40 años (Elborn *et al.*, 2016).

2.3. Diferencias entre sexos

En un estudio realizado entre 1994 y 2010 en 27 países de la Unión Europea, se observó que las mujeres tienen una tasa de mortalidad ligeramente más alta que los hombres (no significativa), con una tendencia a la baja en ambos, aunque la estandarizada disminuyó de 1,34 en 1994 a 1,03 en 2010 en hombres y de 1,42 a 0,92 en el mismo periodo en mujeres (por un millón de personas/año) mejorando en ambos sexos la mortalidad prematura (años de vida perdidos)(Quintana-Gallego *et al.*, 2015).

En esta misma línea, un trabajo realizado en EE.UU demostró que las mujeres tienen una mediana de esperanza de vida más corta que los varones (36 frente a

38.7 años, $p < 0,001$) y ser mujer supone un factor de riesgo significativo de muerte, al objetivarse que éstas eran colonizadas por varias bacterias más tempranamente y tenían una peor evolución de las infecciones causadas por patógenos comunes en FQ (Harness-Brumley *et al.*, 2014).

2.4. Dependencia geográfica y ambiental

Un estudio publicado en 2010 comparó la diferencia entre países de la Unión Europea (UE) con otros no pertenecientes, constatando que la mediana de edad de los pacientes de FQ de la UE fue de 10 años comparada con los 12,1 del resto. La proporción de enfermos mayores de 40 años fue superior en los países de la UE que en los no UE (5% frente al 2%). Probablemente debido a que en éstos últimos existe un infradiagnóstico y consecuentemente, una mortalidad prematura en la infancia (McCormick *et al.*, 2010).

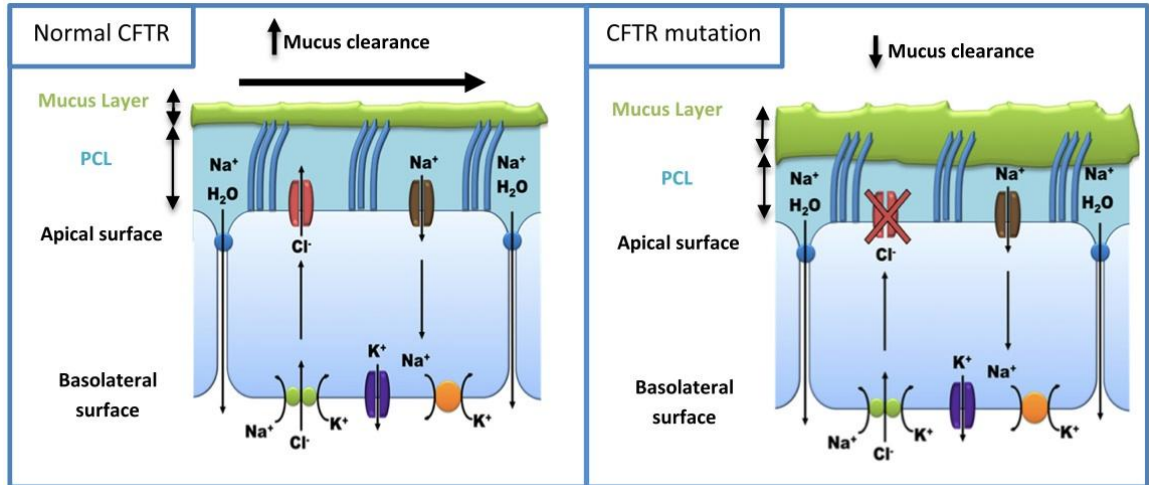
Pero también, pueden existir diferencias dentro de un mismo país, pues el trabajo realizado en EE.UU (2007-2012) puso de manifiesto variaciones regionales significativas en lo que se refiere a las características demográficas, seguro sanitario, patógenos, uso de medicación y comorbilidades (sin impacto en la mortalidad regional) aunque la mortalidad por cada grupo de edad fue superior en el sur de EE.UU. Las disimilitudes entre regiones pueden deberse entre otras cosas, a la existencia de distintos grados de polución ambiental, lo que puede afectar a la frecuencia de las exacerbaciones (Kopp *et al.*, 2015).

3. FISIOPATOLOGÍA

La FQ es una enfermedad genética causada por mutaciones en el gen CFTR (Figura nº 1). La enfermedad avanzada está caracterizada por la infección bacteriana crónica de las vías aéreas, la inflamación neutrofílica, el acúmulo de moco y la formación de bronquiectasias; sin embargo, la transición entre ambas situaciones que va desde el defecto primario en el gen CFTR hasta la deficiencia grave pulmonar, permanece aún desconocida (Amaral, 2015). Se han desarrollado

modelos animales en cerdos, hurones y ratas que simulan la FQ en humanos (Rogers *et al.*, 2008).

Figura nº1. Gen CFTR normal y gen CFTR mutado en fibrosis quística.



Tomado de Kumar *et al.* (2014).

Según algunos estudios, la obstrucción de la vía aérea y el atrapamiento aerógeno observado en niños a los 2-3 meses de edad podría ser en parte congénito (Hoo *et al.*, 2012).

3.1. Mecanismos productores de alteraciones patológicas

3.1.1. Pérdida de función de CFTR sin hiperabsorción de sodio:

La conductancia transmembrana y el canal epitelial de la conductancia de sodio se encuentran en paralelo en la membrana apical, y la alteración de la misma aumenta las propiedades electrofisiológicas dependientes de Na sin incrementar la absorción del mismo (Chen *et al.*, 2010).

3.1.2. pH reducido en la superficie líquida de las vías aéreas:

La pérdida de CFTR elimina la secreción de bicarbonato por parte del epitelio de las vías aéreas (en modelos porcinos), sin embargo en niños mayores y adultos esto varía dependiendo del genotipo (Garland *et al.*, 2013).

3.1.3. La presencia de líquido ácido en la superficie de las vías aéreas dificulta la eliminación bacteriana:

Constituye el comienzo de la espiral que provoca el paso de un pulmón estéril, en el recién nacido, a uno crónicamente colonizado (Rogers *et al.*, 2008).

3.1.4. Anclaje del moco a los conductos de las glándulas submucosas:

Es una de las características de la enfermedad que le llevó a recibir el nombre de “Mucoviscidosis” (Quinton, 2008) y está presente en múltiples órganos (pulmones, intestino, páncreas y vesícula).

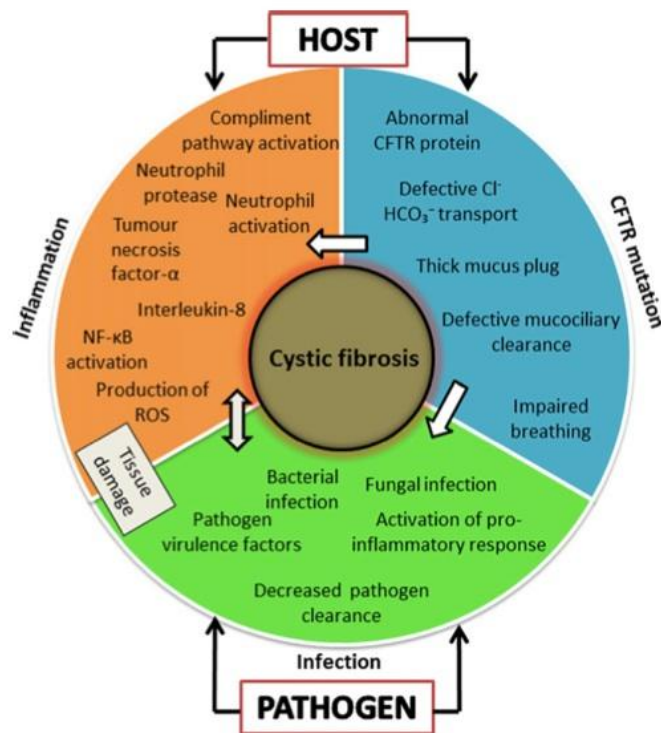
3.1.5. La infección de las vías aéreas precede a la inflamación:

Pasadas unas horas tras el nacimiento, los niños con FQ tienen un defecto en sus defensas que les impiden la eliminación de muchos tipos bacterianos, que puede ser el inicio de una cascada de inflamación y remodelación de la vía aérea. Más tarde, los tipos de infección se delimitan a especies predominantes, probablemente por la interacción entre el hospedador cambiante y las adaptaciones genéticas por parte de las bacterias. Por tanto, aunque la colonización precede a la inflamación, las respuestas inflamatorias y sus resoluciones, las reacciones inmunes adaptativas o todo ello, podría ser anormal.

En definitiva, en la FQ tiene lugar un fallo en el aclaramiento del moco que lleva a la colonización por patógenos oportunistas y esto, a una invasión por parte de los neutrófilos produciéndose la liberación de sustancias oxidantes y proteasas, lo que desemboca en un daño progresivo y en un ciclo que se perpetúa, tal como se sistematiza en las Figura nº 2.

Entender los orígenes, cuantificar los defectos iniciales, junto con una intervención temprana, supondrían grandes diferencias para las situaciones o las consecuencias de las personas con esta enfermedad.

Figura nº 2. La fisiopatología de la FQ. Resultado de la interacción entre un CFTR defectuoso, infección e inflamación.



Tomado de Kamath *et al.* (2015).

3.2. Mutaciones del gen CFTR

Se han identificado alrededor de 2000 mutaciones en la región 7q31.2 que codifica para la proteína CFTR, divididas en seis clases. En condiciones normales, el gen CFTR se transcribe a ARNm y posteriormente se codifica la proteína CFTR. La proteína es glicosilada en el aparato de Golgi y transportada e incorporada a la membrana celular. En individuos sanos, el canal se abre en respuesta al 3', 5'-adenosinmonofosfato AMPc (AMP cíclico) y a la proteína quinasa A, permitiendo la salida de cloro.

Los diferentes tipos de mutaciones que se han descrito se resumen a continuación y se muestran en la Figura nº 3:

3.2.1. Mutaciones de clase I:

Delección y una modificación del codón de parada, que produce un defecto en la síntesis proteica y no hay canal de cloro.

3.2.2. Mutaciones de clase II:

Causan proteínas inmaduras con un plegamiento anormal, que se degradan por las proteasas celulares y no se integran en la superficie celular.

3.2.3. Mutaciones de clase III:

Ocasionan cambios en la secuencia de aminoácidos, que dan como resultante una proteína defectuosa que es insensible al AMP cíclico y proteína quinasa A.

3.2.4. Mutaciones de clase IV:

Dan lugar a la producción de una proteína defectuosa con una reducida conductancia al cloro.

3.2.5. Mutaciones de clase V:

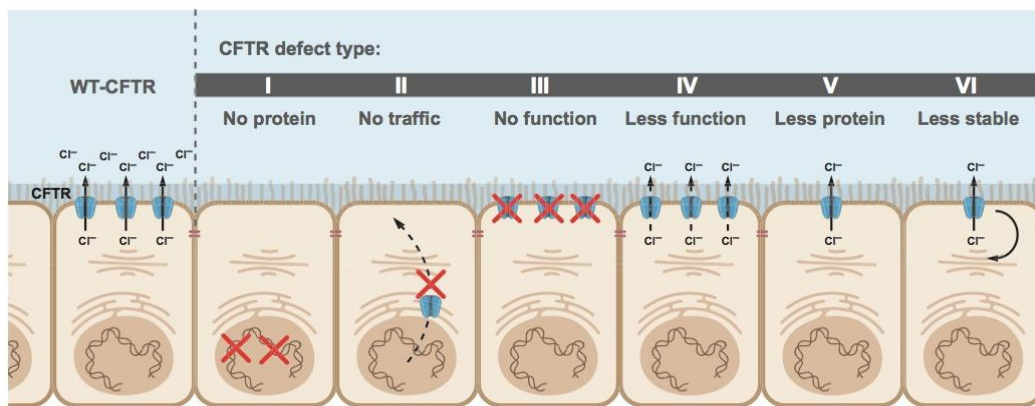
Existe un defecto en la transcripción, que provoca una disminución de la cantidad de proteína funcional en la membrana celular.

3.2.6. Mutaciones de clase VI:

Alteran la estabilidad de CFTR en la membrana, como es el caso de la mutación c.120del23, con lo que se pierde el fragmento N-terminal de CFTR que es el que se ancla al citoesqueleto.

La mutación más prevalente en Europa causante de más del 70% de los alelos mutados en FQ (Pittman & Ferkol, 2015) es DelF508 (ó c.1521_1523delCTT), encuadrable en la clase II antes descrita, que consiste en la delección del codón que codifica fenilalanina en la posición 508 y supone la delección del canal de cloro.

Figura nº 3. Mutaciones del gen CFTR.



CFTR: Regulador de la Conductancia Transmembrana en FQ; WT: wild-type.
Tomado de Amaral *et al.* (2015).

No obstante, existen diferencias entre individuos que poseen la misma mutación, esto se debe a modificaciones genéticas (sexo, raza, etnia), estatus socioeconómico, estado nutricional y exposición ambiental (como el humo de tabaco). Se ha descrito que pacientes que tienen las mismas variantes de CFTR, presentan diferencias sustanciales en la gravedad de la enfermedad pulmonar, explicado en más del 50% por variación genética no-CFTR.

3.3. Moduladores de la enfermedad

Un metaanálisis de 6365 pacientes con FQ, identificó cinco locus asociados significativamente con variaciones en la enfermedad pulmonar (chr3q29, chr5p15.3, chr6p21.3, chrXq22-q23, chr11p12-p13) (Corvol *et al.*, 2015).

En esta línea, se han descrito genes que parecen jugar un papel significativo modulando la gravedad de la FQ:

3.3.1. MBL2 (mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble):

La deficiencia de este gen es muy prevalente en humanos y parece predisponer a los individuos a infecciones graves del tracto respiratorio. Se ha planteado que su déficit se asocia con una peor función pulmonar, adquisición más temprana de *P. aeruginosa* y una mayor incidencia de muerte o necesidad de trasplante (Chalmers *et al.*, 2011).

3.3.2. TGF- β (Transforming Growth Factor beta):

Tiene funciones directas en el remodelado del tejido y puede contribuir a empeorar la función pulmonar, dando lugar a cambios fibróticos progresivos en la arquitectura del pulmón. Ha sido confirmado como un gen modificador (Drumm *et al.*, 2005).

3.3.3. Polimorfismos para IFRD1 (interferon-related developmental regulator 1):

Se observó en pacientes que tienen una mejor evolución de la enfermedad. También se ha detectado que los genes inflamatorios IL-1 β , TLR9, TNF- α , CD95, STAT3 y TNFR pueden modificar el defecto básico de FQ. TLR5 se asoció con una mejora en el índice de masa corporal en adultos pero no en niños con FQ (Blohmke *et al.*, 2010).

3.3.4. La presencia de una variante en DCTN4 (que codifica la proteína dynactina-4):

Se asoció significativamente con una edad temprana para la primoinfección y para la infección crónica por *P. aeruginosa*, menor edad para la primera por *P. aeruginosa* mucóide y acortamiento del tiempo de conversión de cultivo positivo de *P. aeruginosa* a *P. aeruginosa* mucóide.

4. COMPLICACIONES INFECCIOSAS

4.1. Infecciones en pacientes no trasplantados

La infección crónica y la inflamación son características definitorias de la enfermedad de las vías aéreas en la FQ. Los cambios en su fisiología a través de la pérdida de función del CFTR se manifiestan por una serie de disfunciones inmunológicas que permiten la colonización por una variedad de bacterias, hongos y virus patógenos, la interacción entre ellos y su persistencia (Tang *et al.*, 2014).

Los esputos de los pacientes son ricos en nutrientes, lo que puede favorecer el crecimiento microbiano, también se encuentran en ellos aminoácidos en grandes

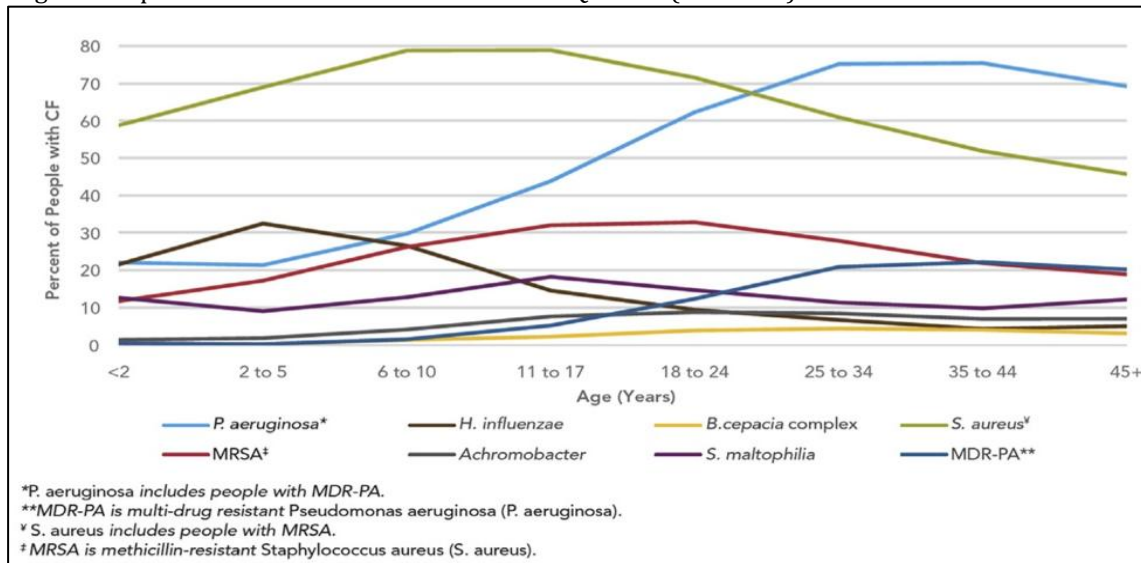
cantidades, lo que se relaciona con la gravedad (Thomas *et al.*, 2000). Además, el lavado broncoalveolar y el tejido pulmonar de las vías aéreas bajas son ricos en hierro, lo que unido a la patogenicidad de los agentes, puede provocar en la enfermedad una exacerbación que se manifiesta clínicamente con aumento de la tos, la disnea y la producción de esputo, además de síntomas sistémicos como fatiga, anorexia y pérdida de peso (Tabla nº 2 y Figura nº 4).

Tabla nº2. Potencial patogénico de los microorganismos comúnmente hallados en las infecciones crónicas de las vías aéreas de pacientes con FQ o en las exacerbaciones pulmonares.

Conocido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Burkholderia multivorans</i> <i>Burkholderia cenocepacia</i> <i>Burkholderia dolosa</i> <i>Aspergillus</i> spp <i>Scedosporium</i> spp <i>Mycobacterium abscessus</i> Virus Influenza Virus respiratorio sincitial
Posible / Probable	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Mycobacterium avium</i> complex Bacterias anaerobias (<i>Prevotella</i> spp) Grupo <i>Streptococcus anginosus</i> Virus respiratorios distintos al virus influenza y virus respiratorio sincitial
Desconocido	<i>Nocardia</i> spp <i>Pandora</i> spp Otros miembros del complejo <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Inquilinus</i> spp <i>Trichosporon</i> spp
Improbable	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Achromobacter</i> spp <i>Ralstonia</i> spp <i>Burkholderia gladioli</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Candida albicans</i>

Adaptado de Gilligan *et al.* (2014).

Figura nº 4. Gérmenes encontrados en los pulmones de pacientes con fibrosis quística por edad. Registro de pacientes de la Fundación de Fibrosis Quística (año 2012).



Tomado de Gilligan *et al.* (2014).

Son comunes las coinfecciones entre diferentes especies de bacterias, hongos y virus. Según se deduce de los trabajos de Hoiby *et al.* (1974) y Wahab *et al.* (2004), existen coinfecciones en la mayoría de los pacientes. Petersen *et al.* (1981) encontraron que el 13% de las exacerbaciones respiratorias agudas se asocian a la presencia simultánea de infecciones bacterianas y no bacterianas. Burns *et al.* (1998) calcularon una media de 2,9 especies bacterianas patógenas por muestra (rango de 0 a 10). Rogers *et al.* (2004) publicaron que los estudios de detección de ADN sugieren que las comunidades bacterianas son más diversas de lo que detectan los métodos de cultivo. Anzaudo *et al.* (2005) objetivaron que el 31% de los pacientes hospedan dos o más especies bacterianas simultáneamente, como queda ilustrado en la Figura nº 5.

Figura nº 5. Coinfecciones descritas en las vías aéreas de pacientes con fibrosis quística.

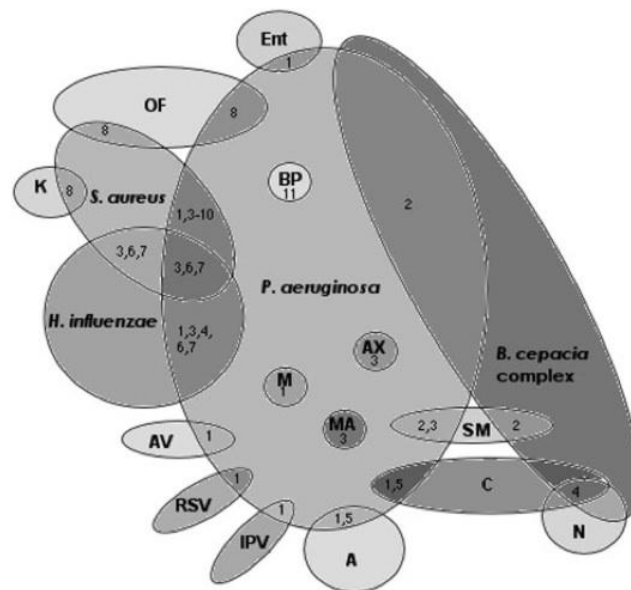


Fig. 2. Venn diagram showing reported coinfections of the CF airways. (NB: coinfection does not necessarily imply direct interaction between species.) A, *Aspergillus* spp.; AV, adenovirus; AX, *A. xylosoxidans*; BP, bacteriophage; C, *Candida* spp.; Ent, enterobacteria; IPV, influenza and/or parainfluenza virus; K, *Klebsiella* spp.; M, mycoplasma; MA, *Mycobacterium abscessus*; N, *Neisseria* spp.; OF, oropharyngeal flora; RSV, respiratory syncytial virus; SM, *S. maltophilia*. Numbers refer to references: 1, Petersen *et al.* (1981); 2, Lambiase *et al.* (2006); 3, Wahab *et al.* (2004); 4, Moore *et al.* (2005); 5, Burns *et al.* (1998); 6, Hoiby (1974); 7, Lording *et al.* (2006); 8, Santana *et al.* (2003); 9, Alvarez *et al.* (2004); 10, Anzaudo *et al.* (2005); 11, Ojeniyi *et al.* (1991).

Tomado de Harrison *et al.* (2007).

No obstante, la coinfección no necesariamente implica interacción directa entre especies ni está relacionada con el lugar de la toma de muestra en el tracto respiratorio, debido a la naturaleza compartimental que tiene el árbol y la alta viscosidad del moco en FQ (Nixon *et al.*, 2001).

La población patógena existente en el pulmón es consecuencia de la selección ejercida por el hospedador, el medio ambiente y la interacción sinérgica o antagónica entre las especies de los microorganismos presentes.

4.1.1. El sinergismo

Tiene lugar entre distintas especies implicadas en FQ, se ha establecido basándose en hallazgos como *Pseudomona aeruginosa* que al producir alginato puede

provocar una hipoxia local y además 3-oxo-C₁₂-homoserina lactona y 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona que tiene efectos inmunomoduladores. Los virus respiratorios sincitiales (VRS) son capaces de hacer más susceptibles a los enfermos al padecimiento de una colonización crónica por *P. aeruginosa* al potenciar la unión de ésta a las células epiteliales. También *Staphylococcus aureus* sensibiliza al pulmón para una consecuente infección por *P. aeruginosa* que a su vez abre el camino a *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans* y *Mycobacterium abscessus*. Así mismo, en estos pacientes la flora orofaríngea puede exacerbarse y debido a ello es posible encontrar especies típicas de las vías respiratorias altas en las bajas. Además la existencia de fagos pueden inducir cambios en *P. aeruginosa* asociados a incrementos en la mortalidad por FQ.

4.1.2. El antagonismo

Se puede deber a la competición por recursos escasos o la provocación de efectos inhibidores del crecimiento por otros agentes. *P. aeruginosa* puede lisar las células de *S. aureus* y otras bacterias Gram positivas (Palmer *et al.*, 2005). Se ha visto que la producción de bacteriocina (más frecuente en los aislados de casos clínicos que en las muestras ambientales) es capaz de matar gérmenes pertenecientes a otro clan, con el resultado de la disminución de la densidad de colonias o incluso su virulencia. Algunos productos segregados por *P. aeruginosa* pueden inhibir la formación de biofilm de *Aspergillus fumigatus*. Éste convierte los metabolitos de fenazina de *P. aeruginosa* en componentes con toxicidad importante que pueden inducir sideróforos fúngicos (Mowat *et al.*, 2010).

Otros como la piocianina, detienen el crecimiento de *Cándida albicans* y *P. aeruginosa* se liga a las superficies de las hifas del hongo. La transición de *C. albicans* a la forma de hifas, es inhibida por la molécula homoserina lactona QS secretada por *P. aeruginosa*, por tanto protege al hongo de un ataque bacteriano (Hogan & Kolter, 2002). *C. albicans* secreta QS, farnesol, que impide la secreción de la señal QS PQS por parte de *P. aeruginosa*. En estudios de muestras de esputos de pacientes con FQ, *C. albicans* se asoció con *P. aeruginosa* en el 80% de los casos en concordancia con trabajos previos (Delhaes *et al.*, 2012). Una señal

QS de *B. cenocepacia* (cis-2-acido dodecanoico) también inhibe la transición morfológica en *C. albicans* (Boon *et al.*, 2008).

Datos recientes indican, que el oxígeno reducido en el pulmón de pacientes con FQ promueve el crecimiento de *P. aeruginosa* (Yoon *et al.*, 2002) y otras bacterias anaerobias. *C. albicans* puede crecer también bajo condiciones anaeróbicas (Dumitru *et al.*, 2007). Bacterias y hongos tienen la capacidad de formar un biofilm en consorcio.

4.1.3. Comportamiento parasitario

Pueden existir especies que sólo actúen como parásitos, aprovechándose de las otras, de la presión de selección o la estimulación de los macrófagos mediante la presencia de otra bacteria (por ejemplo *Lactobacillus casei*). Esto último se ha visto en experimentos con ratones, en los que la suplementación con *Latobacillus casei* o yogurt natural, ha estimulado la actividad de los macrófagos alveolares, incrementando el aclaramiento de *P. aeruginosa* en las vías respiratorias (Alvarez *et al.*, 2001) y acelerando la recuperación de la infección por *Streptococcus pneumoniae* (Villena *et al.*, 2005).

4.1.4. La interacción hospedador-agente

En el transcurso de las infecciones crónicas se producen cambios en los patógenos como consecuencia de la presión de selección, coinfecciones y genotipos diferentes, distintas respuestas a la intervención, resistencia a los antibióticos, disminución de la mortalidad y modificación de la mucosidad. Como consecuencia, aparecen pequeñas colonias de bacterias “variantes” que disminuyen la producción de factores de virulencia asociados a los procesos agudos o se incrementa la virulencia de cepas, en función de la competitividad entre ellas.

Según Tang *et al.* (2014), la infección crónica por *P. aeruginosa* frecuentemente adquiere fenotipos hipermutadores a través de una deficiencia en el mecanismo reparador, proporcionando resistencia antibiótica y virulencia adaptada. Las repuestas inflamatorias son moduladas a través de cambios en la estructura del Lípido A y la expresión de flagelina. Esto concede resistencia a los péptidos antimicrobianos (AMP) y altera la producción de CXCL8 a través del receptor Toll-

like (TLR) (Amaral, 2015). La pérdida de motilidad o los cambios en la expresión de flagelina pueden ocurrir para evadir el reconocimiento por TLR5 y la fagocitosis por los macrófagos alveolares. Su presencia puede inducir también el desarrollo de células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) dando lugar a la falta de las respuestas de las células T (Tang *et al.*, 2014).

Por otro lado, la infección por rinovirus puede incrementar la expresión de moléculas de adhesión celular (como el antígeno carcinoembriónico) relacionado con la adhesión celular (CEACAMs), y aumenta la unión de los patógenos bacterianos a las células del huésped.

El descenso de la captación de conidias de *A. fumigatus* por las células epiteliales deficientes en CFTR, tiene como resultado un aclaramiento reducido y un incremento de la muerte celular. La germinación de la spora a la forma hífica da lugar a una respuesta inflamatoria incrementada. Las células epiteliales bronquiales inducen una respuesta de los linfocitos T-(Th) helper 2 y Th 17 mediada por las células T, partícipes en la aspergilosis broncopulmonar alérgica, que puede ser potenciado por *A. fumigatus* mediante la subregulación del receptor de vitamina D (VDR) y el incremento de la producción de interleukina (IL)-5/IL-13 por la gliotoxina.

Algunos documentos de consenso europeos sostienen que los pacientes con FQ deberían ingresar en habitaciones individuales con sus propios baños y que sólo los que viven en la misma casa, pueden compartirlas. Los que sufren exacerbaciones agudas y patógenos transmisibles, tendrían que llevar mascarillas en el hospital. Incluso algunas guías recomiendan que ningún paciente con FQ acuda a un evento a puerta cerrada (Saiman *et al.*, 2014) y en EE.UU y Canadá aconsejan mantener una distancia de 2 metros entre enfermos con FQ en los eventos que tengan lugar en el exterior.

Existen variaciones con respecto a las recomendaciones para el personal sanitario pues en EE.UU se fomenta el uso de batas de manga larga y guantes, mientras que en Europa, sólo han de usarse éstas o delantales, si va a producirse contacto físico.

4.2. Infecciones bacterianas en pacientes no trasplantados

Las lesiones del tracto respiratorio favorecen la colonización persistente por patógenos bacterianos que contribuyen a perpetuar y acelerar el proceso inflamatorio. La diversidad de microorganismos presentes en las muestras tomadas en estas localizaciones ha sido denominada “microbiota” de FQ.

Los patógenos identificados son *P. aeruginosa* mucoide y no mucoide, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Burkholderia cenocepacia*. Dentro de las especies de *Burkholderia*, *B. cenocepacia* es el organismo más común de este género en Reino Unido, Europa y Canadá, mientras que en Norte América y Australia parece haber una mayor prevalencia de *B. multivorans* y otros miembros (Elborn, 2006).

Pero el espectro de patógenos bacterianos en FQ se ha expandido en la última década, añadiéndose bacterias Gram negativas aerobias como *S. maltophilia*, *Pandoraea* sp. (*P. apista*, *P. pnomenusa*), *Ralstonia* sp., *A. xylosoxidans*, micobacterias no tuberculosas como *M. abscessus* y cocos Gram positivos anaerobios como *Gemella* sp., y *Streptococcus milleri group* (SMG) que se ha asociado con exacerbaciones pulmonares.

En un estudio realizado con el esputo de pacientes con FQ, además de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, se hallaron más de 60 géneros bacterianos filogenéticamente distintos, que no están asociados típicamente con la patogénesis de FQ (Guss *et al.*, 2011). Usando métodos moleculares de identificación, dos grupos de bacterias anaerobias (*Prevotella* y SMG) se han demostrado como altamente prevalentes en el esputo (Mahenthiralingam, 2014).

La infección crónica por *S. maltophilia* es un factor de riesgo independiente porque provoca exacerbaciones pulmonares graves en los enfermos y se asocia con un número tres veces mayor de muerte o necesidad de trasplante pulmonar (Waters *et al.*, 2013). La incidencia de *S. maltophilia* está aumentando en USA y en Europa, como lo demuestra el estudio realizado en un hospital de Londres, comprobándose que pasó de un 1% en 1985 a un 4% en 2005 (Millar, Simmonds, & Hodson, 2009).

Por otro lado, la de *B. cepacia* está disminuyendo: de un 9% en 1990 a un 4% en 2005 en Europa y en EE.UU, donde también decrece la prevalencia de *P. aeruginosa*

(Millar, Simmonds, & Hodson, 2009) y también la de micobacterias no tuberculosas en pacientes con FQ del 3 al 19% (Jordan *et al.*, 2007) siendo *M. abscessus complex* más común en Europa mientras que *Micobacterium avium complex* predomina en EE.UU.

P. aeruginosa está presente en más del 70% de pacientes con FQ (Mahenthiralingam, 2014), su selección nicho-específica reduce su habilidad para causar infecciones agudas a lo largo de una amplia gama de hospedadores, mientras que mantiene la capacidad para la infección crónica en el individuo con FQ (Lorè *et al.*, 2012).

La colonización bacteriana parece cambiar con la edad y así *H. influenzae* y *S. aureus* predominan en las tempranas (bebés y niños) y entre la adolescencia a la adulta *P. aeruginosa*. También la presencia o infección recurrente por *Clostridium difficile* es común en los pacientes con FQ mayores. Además se ha publicado la transmisión entre individuos (Tang *et al.*, 2014). La prevalencia de *P. aeruginosa* parece que se correlaciona inversamente con la incidencia de *S. aureus*, reflejando una probable relación antagónica (Hauser *et al.*, 2011). Durante la colonización crónica por *P. aeruginosa* se ocasiona una conversión fenotípica como la pérdida de movilidad, permitiendo así evadir el reconocimiento por parte del hospedador y la fagocitosis (Mahenthiralingam, Campbell, & Speert, 1994), proceso que se ha observado también en cronicidades por *S. aureus*.

Estudios en los que se han usado métodos moleculares han encontrado una correlación estadística con la edad y la infección por *H. influenzae*, *S. maltophilia* y *P. aeruginosa* y una estabilidad relativa de la microbiota en FQ, con una mayor variabilidad inter-individuos que intra-individuos (Cox *et al.*, 2010).

Un incremento en la edad y la gravedad de la enfermedad se ha correlacionado positivamente con una reducción en la diversidad de la flora microbiana, atribuido al uso prolongado de antibióticos (Zhao *et al.*, 2012).

4.3. Infecciones fúngicas en pacientes no trasplantados

A diferencia de los patógenos bacterianos, los hongos son eucariotas y tienen mecanismos celulares similares a los hospedadores, en éste caso el ser humano. Un

trabajo en el que se investigó la microbiota fúngica presente en la cavidad oral de individuos sanos (Ghannoum *et al.*, 2010) usando enjuagues bucales, se identificaron 74 géneros cultivables y 11 no cultivables; 39 de ellos se encontraron en una persona, 16 estaban presentes en dos, 5 en tres y 15 géneros (incluyendo los no cultivables) en ≥ 4 (20%) de los individuos mediante pirosecuenciación con primers ITS (Fungal Internal Transcribed Spacer). Al igual que sucede con la microbiota, la epidemiología de las infecciones fúngicas invasivas está cambiando. La frecuencia de especies de *Aspergillus* no *fumigatus* está aumentando, así como las feohifomicosis y epidemias de hongos resistentes a los azoles (Bille, Marchetti, & Calandra, 2005). La implementación de las técnicas de cultivo y las moleculares han llevado a la identificación de especies de *Scedosporium*, y otros géneros fúngicos como *Malassezia* (Nagano *et al.*, 2010) o *Trichosporon*, (que es resistente a los antifúngicos anfotericina y equinocandinas) y puede encontrar un nicho en las vías aéreas de pulmones con FQ, debido al creciente uso de agentes antifúngicos para tratar la enfermedad asociada a *Aspergillus* y *Scedosporium* (Miceli, Díaz, & Lee, 2011).

La cinética, la dinámica y la relevancia de la microbiota pulmonar sigue siendo desconocido. A pesar de la creciente tasa de detección de hongos en las vías aéreas de FQ, la importancia patogénica en el curso temporal de la FQ permanece pobremente entendido y en debate. Un trabajo publicado en 2012 (Delhaes *et al.*, 2012) aporta los primeros datos en los que se estudia la microbiota presente en pacientes con FQ. Es bien conocido el papel de *A. fumigatus* en la Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), sin embargo no se conoce la relevancia de la colonización crónica o de la infección por *A. fumigatus* sin el fenotipo clínico de ABPA, ni la de la infección crónica por *C. albicans*. La persistencia de hongos en los cultivos asociados con un incremento de las exacerbaciones sugiere que pueden jugar un papel en la fisiopatología. La evidencia reciente sugiere que los cultivos de esputo de FQ deben incluir la detección de hongos. La colonización fúngica puede tener un importante impacto en el desarrollo de la enfermedad pulmonar pero se requieren más estudios. Es importante saber si un determinado hongo juega un papel como comensal, colonizador o patógeno en FQ. La situación de inmunodepresión, la gravedad de la enfermedad, el estado del hospedador, el tipo

de hongo (su virulencia y capacidad de superar las respuestas inmunes) son determinantes claros de la patogenicidad de estos agentes.

4.3.1. *Candida*

En el trabajo de Ghannoum *et al.* (2010) dentro del género *Candida*, las especies que se identificaron con mayor frecuencia fueron *C. albicans* (40%), *C. parapsilosis* (15%), *C. tropicalis* (15%), *C. khmerensis* (5%) y *C. metapsilosis* (5%). Entre los géneros cultivables, 61 de ellos con una sola especie presente y 13 con 2 a 6. En la Tabla nº 3 se detallan los hongos identificados.

Tabla nº 3. Distribución de las diferentes especies fúngicas en la microbiota oral de individuos sanos.

Fungal genera	Species	Frequency
<i>Alternaria</i>	<i>tenuissima</i>	2
	<i>triticina</i>	1
<i>Aspergillus</i>	<i>amstelodami</i>	2
	<i>caesiellus</i>	1
	<i>flavus</i>	1
	<i>oryzae</i>	1
	<i>penicillioides</i>	1
<i>Candida</i>	<i>ruber</i>	2
	<i>albicans</i>	8
	<i>khmerensis</i>	1
	<i>metapsilosis</i>	1
	<i>parapsilosis</i>	3
<i>Cladosporium</i>	<i>tropicalis</i>	3
	<i>cladosporioides</i>	10
	<i>herbarum</i>	2
	<i>sphaerospermum</i>	1
	<i>tenuissimum</i>	1

Tabla nº 3. Distribución de las diferentes especies fúngicas en la microbiota oral de individuos sanos (continuación).

Fungal genera	Species	Frequency
<i>Cryptococcus</i>	<i>cellulolyticus</i>	1
	<i>diffluens</i>	1
<i>Fusarium</i>	<i>culmorum</i>	2
	<i>oxysporum</i>	1
	<i>Poae</i>	1
<i>Glomus</i>	<i>fulvum</i>	1
	<i>mosseae</i>	3
<i>Ophiostoma</i>	<i>floccosum</i>	1
	<i>pulvinisporum</i>	1
<i>Penicillium</i>	<i>brevicompactum</i>	1
	<i>glabrum</i>	1
	<i>spinulosum</i>	1
<i>Phoma</i>	<i>foveata</i>	1
	<i>plurivora</i>	1
<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	2
	<i>cerevisiae</i>	6
	<i>ellipsoideus</i>	2
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>pseudorouxii</i>	1
	<i>Rouxii</i>	1

Tomado de Ghannoum *et al.* (2010).

Los adultos con FQ tienen una mayor incidencia de colonización fúngica (42%) y de enfermedad invasiva (11%) que pacientes sin FQ (Iversen *et al.*, 2007) debido a la alteración en el aclaramiento del moco, la disfunción inmunológica local y el uso de antibioterapia. Además, el tracto respiratorio está comunicado anatómicamente con la atmósfera, donde existe una rica fuente de esporas fúngicas aéreas. La presencia de hongos se ha asociado con mayor edad, menor FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo) y el uso de antibióticos inhalados (Russell, Gadhok, & Simmonds, 2013).

En un análisis retrospectivo de 55 pacientes pediátricos (62% de ellos con FQ) sometidos a trasplante pulmonar entre 2002 y 2007 en Cleveland (Liu *et al.*, 2009a), la colonización antes de la intervención estaba presente en 29 de los 41

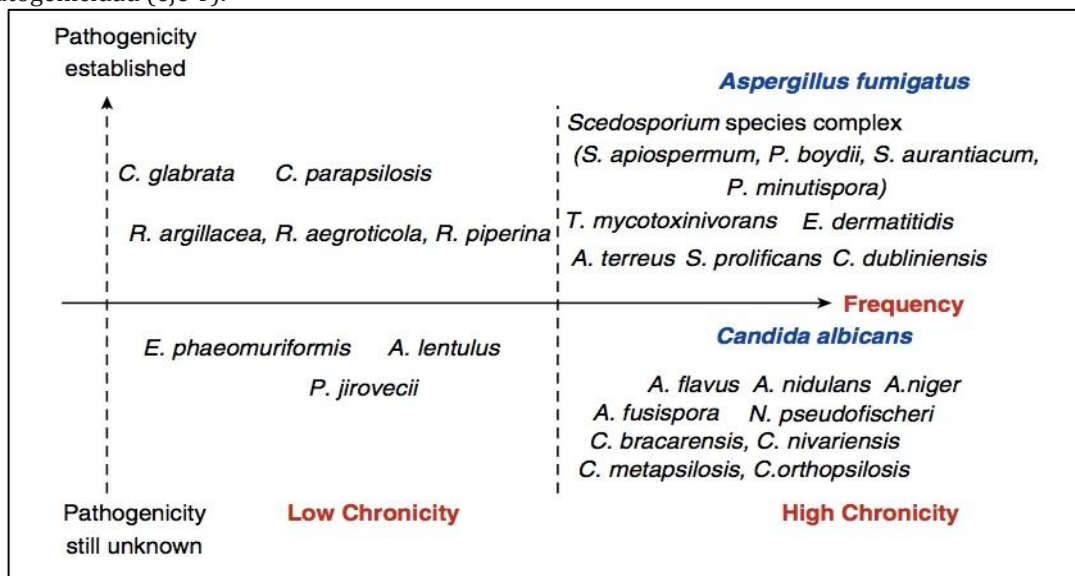
sujetos en los que se evaluó. Los afectados con FQ tenían tasas más altas de cultivos fúngicos previamente comparado con otras causas. Las especies de *Candida* fueron las más frecuentes, seguidas de *Aspergillus*. 14 niños recibieron profilaxis antifúngica (mediana de 51 días) y a pesar de ello 11 estaban colonizados, mientras que en los 18 restantes no se aplicó terapia antifúngica. Los sujetos con FQ recibieron profilaxis en un mayor porcentaje que los de otras etiologías.

4.3.2. *Aspergillus*

Según un estudio retrospectivo llevado a cabo en el Johns Hopkins Hospital, la prevalencia de hongos filamentosos en esputo de pacientes pediátricos y adultos con FQ se ha incrementado del 2% en 1997 al 28,7% en 2007 (Sudfeld *et al.*, 2010) y también se ha observado en los cultivos fúngicos del 6% en 1995 al 15% en 2005 (Lipuma, 2010).

En la Figura nº 6 se plasma la biodiversidad fúngica en FQ según frecuencia de aislamiento (eje X) y patogenicidad (eje Y) y puede observarse también la división según la cronicidad. *A. fumigatus* encuentra entre los hongos filamentosos más frecuentemente aislados (Chmiel *et al.*, 2014).

Figura nº 6. Biodiversidad fúngica en fibrosis quística según frecuencia de aislamiento (eje X) y patogenicidad (eje Y).



Géneros de baja cronicidad: A.= *Aspergillus*; C.= *Cándida*; E.= *Exophiala*; P.= *Pneumocystis*; R.= *Rasamsonia*. Géneros de alta cronicidad: A.= *Aspergillus* (*flavus*, *nidulans*, *niger*); A.= *Acrophialophora* (*fusispora*); C.= *Cándida*; E.= *Exophiala*; N.= *Neosartorya*; P.= *Pseudallescheria*; S.= *Scedosporium*; T.= *Trichosporon*. Tomado de Chmiel *et al.* (2014).

Entre los hongos filamentosos, *A. fumigatus*, *A. terreus* y *S. apiospermum* son los colonizadores más frecuentes de pacientes con FQ junto con la levadura *C. albicans*. Menos constantes y transitorios son *A. flavus*, *A. nidulans* y *Alternaria*. En cambio, más crónicos son *E. dermatitidis* y *S. prolificans*, y exclusivamente asociados con esta enfermedad son *Penicillium emersonii* y *Acrophialophora fusispora* (Pihet *et al.*, 2009). Es interesante poder diferenciar los genotipos de *C. metapsilosis* de los de *C. parapsilosis* y *A. lentulus* de *A. fumigatus*, porque presentan distintos perfiles de susceptibilidad a los antifúngicos.

A. fumigatus se detecta en el esputo del 30% de los afectados de FQ (Chmiel *et al.*, 2014) y de 2001 a 2011 la prevalencia de este hongo en pacientes canadienses se ha triplicado (22%) (Wong *et al.*, 2014).

La colonización crónica por *Aspergillus* se define como el aislamiento del mismo en el 50% o más de las muestras de esputo, recogidos tras 6 meses a un año sin observar deterioro de la función pulmonar ni un incremento en los síntomas respiratorios, mientras que la infección por *Aspergillus* se determina en sujetos colonizados con un deterioro en la función pulmonar, exacerbación respiratoria con o sin tos o una respuesta incompleta, tras un intervalo de 2 a 4 semanas de antibioterapia apropiada (de amplio espectro) (Walicka-Serzysko & Sands, 2015).

Tanto *A. fumigatus* como *S. apiospermum* están asociados con la ABPA pero de forma diferente a lo que sucede con *Candida*. La ABPA fue descrita por primera vez en 1952 por Hinson, Moon, & Plummer (1952) afectando a pacientes con asma o FQ. Aunque en la Conferencia de la Fundación de Fibrosis Quística celebrada en 2011 se establecieron los criterios clásicos para definir la ABPA, se ha propuesto una nueva clasificación inmunológica para la Aspergilosis en FQ, en la que se diferencian cuatro subgrupos (ABPA, sensibilización por *Aspergillus*, Bronquitis por *Aspergillus* y ausencia de enfermedad) (Baxter *et al.*, 2013a).

La sensibilización por *Aspergillus* se trata de una reacción de hipersensibilidad a la colonización pulmonar por el hongo *A. fumigatus* y afecta al 10% de las personas con FQ (Elphick & Southern, 2014). Puede causar ABPA hasta en el 15% de los pacientes (Sabino *et al.*, 2015) y el diagnóstico depende de la combinación de criterios clínicos, radiológicos y serológicos (Stevens *et al.*, 2003). Está relacionada

con un mayor deterioro de la función y la exacerbación de síntomas pulmonares (Baxter *et al.*, 2013b) y son predictores de sensibilización por *Aspergillus* las modificaciones graves de FQ, la FEV1 > 70%, la ausencia de *Pseudomonas* y la exposición a azitromicina (Fillaux *et al.*, 2014). Debe ser tomada en cuenta en cualquier paciente con deterioro clínico que no responda a la terapia antibiótica.

El riesgo de padecer una exacerbación pulmonar que requiera hospitalización se asoció significativamente con la infección persistente por *A. fumigatus* y la diabetes relacionada con la FQ, mientras que no incrementó aquel en pacientes con ABPA (Amin *et al.*, 2010). Pero existe controversia en cuanto al significado de la colonización por *Aspergillus* No-ABPA, que a menudo se asocia con peores hallazgos radiológicos y es un factor de riesgo independiente para la hospitalización (Amin *et al.*, 2010). Un estudio prospectivo en el que se utilizaron métodos moleculares (secuenciación de ITS, β -tubulina y calmodulina) para identificar especies de *Aspergillus*, sugiere que existe una asociación de *A. fumigatus sensu stricto* con las vías aéreas en FQ, además mediante proteómica se comprueban los cambios que se producen en *Aspergillus* sp. para adaptarse a la hipoxia (Barker *et al.*, 2012); y también los mecanismos de resistencia a antifúngicos tales como caspofungina (que bloquea la enzima (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano sintasa e inhibe el principal componente de la pared celular) (Middleton, Chen, & Meyer, 2013), concluyendo Lebecque *et al.* (2010) que parece que son factores predisponentes a la colonización por *E. dermatitidis* la presencia de *A. fumigatus* y sus diferentes genotipos, tras el análisis de esputos y aspirados faríngeos en FQ.

4.3.3. *Scedosporium / Pseudallescheria*

Las especies de este complejo son colonizadores crónicos y patógenos emergentes en FQ. Es el segundo hongo filamentoso más común que crece en el esputo de los pacientes y se ha descrito como uno de los colonizadores crónicos de mayor importancia en las vías aéreas de pacientes con FQ. Tiene una distribución ubicua y hay dos especies que con mayor protagonismo causan infecciones en humanos (*S. apiospermum* y *S. prolificans*), siendo la primera la más común (83% de las infecciones) pero la segunda origina más mortalidad (tasas del 77%) probablemente debido a su resistencia antibiótica (Thomson *et al.*, 2015).

La prevalencia varía del 0 al 14% (Pihet *et al.*, 2009) aunque los sujetos que tienen estas especies son menos frecuentemente colonizados por *P. aeruginosa* (Blyth *et al.*, 2010) existiendo la discordancia entre la alta frecuencia de su aislamiento (6,5 a 10%) y su escasa presencia en el medio ambiente, lo que hace que se cuestione el mecanismo que da lugar a la adquisición inicial en FQ.

Scedosporium es un hongo hialino virtualmente idéntico a *Aspergillus* al microscopio. Clínicamente da lugar a una respuesta alérgica, puede causar un amplio espectro de enfermedades y existe riesgo de diseminación en hospedadores inmunodeprimidos. Su similitud en la clínica y en los hallazgos radiológicos con *Aspergillus*, conlleva una dificultad en el diagnóstico que puede ser letal, pues *Scedosporium* es resistente a la anfotericina B, un fármaco frecuentemente usado cuando se sospecha infección por *Aspergillus*.

4.3.4. *Pneumocystis*

Pneumocystis jirovecii conocido previamente como *Pneumocystis carinii f. sp. Hominis* (Stringer *et al.*, 2002) es un hongo pues a partir de 1980, mediante el uso de técnicas de biología molecular ha permitido la reclasificación del género *Pneumocystis* en este reino y la secuenciación de su ARN ribosómico los incluye entre los *Ascomycetos* (Edman *et al.*, 1988). *P. jirovecii* se considera atípico porque no crece en los medios de cultivo ordinarios para hongos, tiene una pared celular frágil que contiene colesterol en lugar de ergosterol, no es susceptible a la mayoría de los antifúngicos, excepto las equinocandinas (que afectan a la síntesis de betaglucano) y es sensible a los antiparasitarios como pentamidina y cotrimoxazol. Posee solamente una copia de ARN ribosómico nuclear, muestra un estenoxenismo sin precedentes entre los hongos de amplia distribución, y es la única especie que infecta a los humanos, extracelular, de tropismo pulmonar y transmitida por vía aérea (Stringer *et al.*, 2002). Se puede identificar por métodos colorimétricos en muestras respiratorias cuando su presencia es abundante, pero difícilmente cuando la carga de microorganismos es baja.

Causa neumonía (Neumonía por *Pneumocystis*, PcP) en individuos inmunodeprimidos (Calderón *et al.*, 2010a), ya que son capaces de unirse específicamente a las células epiteliales alveolares tipo I y proliferar (Dei-Cas,

2000). La colonización por *P. jirovecii* se define como la detección de este microorganismo o su ADN en muestras respiratorias de individuos que no tienen signos o síntomas de neumonía.

Pocos estudios en Europa han evaluado la prevalencia de colonización por este hongo en pacientes con FQ que se sitúa entre el 1,3 y el 21,6% (Calderón *et al.*, 2010b): en Alemania un 7,4% (Sing *et al.*, 2001), en Francia un 1,3% (Gal *et al.*, 2010) y en España un 21,6% (Respaldiza *et al.*, 2005) estudiando muestras de esputo y lavado orofaríngeo de 88 pacientes con FQ mediante PCR anidada del gen mt LSU rRNA de *P. jirovecii*. Éstas diferencias pueden deberse a circunstancias climáticas, a la exposición previa a cotrimoxazol o azitromicina o al estado de inmunosupresión del paciente. Fuera de Europa, en Brasil, Pederiva *et al.* (2012) hallaron por PCR anidada colonizaciones por *P. jirovecii* en el lavado broncoalveolar de 13 de 34 (38,2%) pacientes siendo el genotipo 1 el más frecuente. Es necesario elucidar el papel de este hongo en la historia natural de la FQ, en orden a establecer un manejo clínico de esta enfermedad. La carencia de sistemas de cultivo, ha sido el mayor impedimento para las investigaciones sobre *Pneumocystis*.

En un trabajo (Varela *et al.*, 2004), encontraron una prevalencia de colonización por *P. jirovecii* del 22,7% en pacientes con FQ mediante el estudio de muestras de esputo o LOF. Ninguno de ellos presentó síntomas clínicos ni hallazgos radiológicos de PcP durante un año de seguimiento.

El genotipo 3 parece ser el más adaptado a los pacientes con FQ (Montes-Cano *et al.*, 2007) en los que durante un año se demostró un ciclo continuo de colonización/aclaramiento de *P. jirovecii*, con una tendencia a predominar aunque no parece ser un riesgo para que desarrollen PcP, probablemente porque sus estados inmunitarios son aún capaces de impedir el paso desde el estadio de colonización al de infección. No obstante, se desconoce el papel que pueda desempeñar esta colonización en la historia natural de la enfermedad. En un estudio prospectivo, el 12,5% de los pacientes adultos tenían *P. jirovecii* en el esputo, siendo más propensos a tener enfermedad leve y a estar libres de *P. aeruginosa* (Hernández-Hernández *et al.*, 2012).

El ser humano parece ser el único reservorio conocido para *P. jirovecii* y probablemente adquiere la infección exclusivamente de otros, mediante la transmisión horizontal (aérea) y vertical (transplacentaria) (Calderón, 2010).

4.4. Infecciones víricas en pacientes no trasplantados

Los rinovirus se asocian con los agravamientos pulmonares en FQ, detectándose en el 20-60% de todas las exacerbaciones virales (Wat *et al.*, 2008). Según Esposito *et al.* (2014) en la Tabla nº 4 se muestran los virus hallados en este estudio realizado con frotis nasofaríngeo de 78 pacientes con FQ (47 con exacerbación pulmonar aguda y 31 en situación clínica estable) en el que se evaluaron 17 virus respiratorios (el rinovirus humano fue el predominante, siendo el A el principal en pacientes con exacerbaciones pulmonares).

Las comunidades virales varían en función de su localización en el pulmón de enfermos y contribuyen a la patología de FQ, aumentando el potencial metabólico de los microorganismos residentes, así como con el desarrollo de infecciones o carcinomas (Willner *et al.*, 2012).

Tabla nº 4. Virus encontrados.

	CF patients with acute pulmonary exacerbation (n = 47)	CF patients in stable clinical condition (n = 31)	P*
Single infection, no. (%)	14 (29.8)	9 (29.0)	0.85
HRV, no. (%)	10 (21.3)	4 (12.9)	0.52
A	8 (17.0)	1 (3.2)	0.07
B	0 (0.0)	1 (3.2)	0.39
C	2 (4.3)	2 (6.4)	1.00
Influenza virus, no. (%)	2 (4.2)	2 (6.4)	1.00
A/H1N1	1 (2.1)	1 (3.2)	1.00
A/H3N2	1 (2.1)	1 (3.2)	1.00
Bocavirus, no. (%)	1 (2.1)	1 (3.2)	1.00
Metapneumovirus, no. (%)	1 (2.1)	0 (0.0)	1.00
Respiratory syncytial virus, no. (%)	0 (0.0)	1 (3.2)	0.39
Enterovirus, no. (%)	0 (0.0)	1 (3.2)	0.39
Dual infection, no. (%)	1 (2.1)	0 (0.0)	1.00
HRV + metapneumovirus	1 (2.1)	0 (0.0)	1.00

HRV: Rinovirus humano. Adaptado de Esposito *et al.* (2014).

Las células epiteliales en FQ tienen susceptibilidad aumentada a los virus respiratorios. Se ha descrito que los VRS incrementan la adherencia de *P.*

aeruginosa a las de las vías aéreas y los rinovirus la de *H. influenzae*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* a las del epitelio nasal sanas (Van Ewijk *et al.*, 2007).

4.5. Infecciones en pacientes trasplantados

Los receptores de trasplante de pulmón tienen un riesgo más alto de tener complicaciones infecciosas que los de otros órganos sólidos, por la constante exposición de los pulmones al exterior, además de tener alterado el mecanismo de la tos, así como la circulación bronquial y el drenaje linfático, a lo que se une la intensidad de la inmunosupresión que conduce a un estado persistente de disfunción de los linfocitos T y B.

Las infecciones en el postrasplante provocan el 80% de las muertes ocurridas durante el primer año tras la intervención. El tracto respiratorio y las infecciones relacionadas con catéter son las principales causas de bacteriemias o sepsis.

La infección más común es la neumonía bacteriana, seguido por citomegalovirus (CMV), fúngicas y micobacterias. Un estudio transversal descriptivo que analizó las infecciones en pacientes trasplantados de pulmón por FQ entre 1991 y 2004 en un hospital español (Solé *et al.*, 2006), concluyó que las ocasionadas por CMV alcanzaron un 26% y a largo plazo las fúngicas supusieron la única complicación infecciosa más grave, ambas asociadas a rechazo crónico, desarrollándose formas invasivas pulmonares por *A. fumigatus*; precedidas de *Aspergillus* en esputo durante varios meses a pesar de profilaxis antifúngica.

Bonvillain *et al.* (2007) publicaron un trabajo en el que analizaron los perfiles de infección postoperatoria en 60 pacientes trasplantados pulmonares por FQ y otros tantos sin padecer esta enfermedad en el que se demuestra que los pacientes trasplantados con FQ desarrollaron 278 infecciones respiratorias entre las que se identificaron 307 patógenos, en tanto que sobre el otro grupo aportan datos de 154 y 165 respectivamente. Los pacientes con FQ intervenidos tuvieron significativamente frecuencias más altas de infecciones por *Pseudomonas* y menos tiempo sin estos procesos infecciosos que el resto, pero no se encontraron diferencias significativas en cuanto a afecciones pulmonares por *S. aureus*, *Mycobacteria* y *Aspergillus*, entre ambos grupos.

Mattner *et al.* (2007) analizaron las infecciones postoperatorias y la mortalidad en 208 trasplantados torácicos (137 de pulmón, 51 de corazón y 20 combinados) objetivando 157 casos nosocomiales (la más frecuente la neumonía en 59 de ellos) siendo la FQ un factor de riesgo para la mortalidad.

Entre los patógenos descritos en las infecciones nosocomiales se encuentran bacterias como *S.aureus* (*S. aureus* meticilinsensible/*S. aureus* meticilinrrresistente), *Enterococci*, *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp.), *P. Aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. y *Candida* sp. En la Tabla nº 5 se muestran los microorganismos más frecuentes en cada periodo postrasplante. Entre los dos y los seis meses, la inmunosupresión es máxima lo que puede provocar la reactivación de patógenos latentes presentes previamente a la cirugía en el pulmón donante o en el receptor. Infecciones por CMV, Virus de Epstein Barr (VEB), Virus Herpes Humano-6 (HHV-6), Virus de la Hepatitis B (VHB), Virus de la Hepatitis C (VHC) e infecciones oportunistas (*Aspergillus* sp., *P. jirovecii* y *Listeria monocytogenes*).

Tabla nº 5. Infecciones más frecuentes en el primer mes postrasplante, entre el segundo y el sexto y a partir del sexto mes.

1st month	2nd-6th month	>6 months
Nosocomial infections*		
Respiratory tract infections	Reactivation of latent infections + opportunistic infections	Community-acquired infections/pneumonia
Surgical site infections		
Urinary tract infections		
Catheter infection, sepsis		
Related more to surgery and intensive care	Related more to immunosuppression	
CF lung pathogens: <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Burkholderia cepacia</i> complex <i>B. gladioli</i> ; NTM	Viruses: Cytomegalovirus Epstein-Barr virus Herpes simplex virus Varicella Zoster virus	Viruses: Epstein-Barr virus Respiratory viruses
Other bacteria: <i>S. aureus</i> <i>Enterobacteriaceae</i> Enterococci <i>Acinetobacter</i> spp.	Opportunists: <i>P. jirovecii</i> Toxoplasmosis <i>Aspergillus</i> spp. Nocardia Listeria Mycobacteria (especially NTM)	Respiratory bacteria: <i>S. pneumoniae</i> <i>H.influenzae</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>M. pneumoniae</i> and others
Fungi: <i>Candida</i> spp. (<i>Aspergillus</i> spp.)		CF lung pathogens: <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Burkholderia</i> spp.
Viruses: Herpes simplex virus Respiratory viruses	CF-lung pathogens: <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Burkholderia</i> spp.	Fungi: <i>Aspergillus</i> spp.
	<i>C. difficile</i> infection**	Late-onset <i>C. difficile</i> infection

* Puede ocurrir también en fases más tardías tras el trasplante pulmonar dependiendo de hospitalizaciones prolongadas o recurrentes y la presencia de dispositivos médicos. ** La mayor incidencia tiene lugar en los primeros 3 a 12 meses tras el trasplante asociada a la antibioterapia de amplio espectro e inmunosupresión intensa. Tomado de Hirche *et al.* (2014).

4.6. Infecciones bacterianas en pacientes trasplantados

Se ha descrito que el complejo *B. cepacia* (CBC), *B. gladioli* y *Pandorea* sp. se asocian con peor evolución postrasplante (Quon *et al.*, 2011). Los pacientes colonizados por *B. cenocepacia* y *B. gladioli* son más propensos a sufrir enfermedad invasiva con neumonía, empiema, septicemia y muerte, por lo que son rechazados por algunos centros trasplantadores. *B. gladioli* es genotípicamente distinta de *B. cepacia* pero fenotípicamente muy similar. Es una bacteria gram negativa que está presente en el suelo, plantas y tracto respiratorio de los humanos y es causa de abscesos de pared y neumonía (Kanj *et al.*, 1997), de empiema y septicemia (Khan *et al.*, 1996), rinosinusitis localmente invasiva y bacteriemia persistente (Quon *et al.*, 2011) en pacientes trasplantados. Supone una mortalidad al año por todas las causas de aproximadamente un 23% (Brizendine *et al.*, 2012) siendo la supervivencia de estos enfermos significativamente menor que la de pacientes con o sin CBC (a excepción de *B. cenocepacia*). También se han descrito infecciones recurrentes por *B. pyrrocinia* ó *B. cepacia genomovar IX* en el postoperatorio de un paciente con proceso crónico por dicho microorganismo, previamente al trasplante (Savi *et al.*, 2014).

Sólo han sido publicados resultados favorables a largo plazo, en pacientes con *B. cenocepacia*, en casos individuales (Nash *et al.*, 2010). A pesar de que es considerada una contraindicación relativa para el trasplante pulmonar, Salizzoni, Pilewski, & Toyoda (2014) tuvieron éxito en uno con neumonía por dicho microorganismo, de tal modo que seis años después hacía vida normal sin recurrencia de infección.

También el trabajo realizado en Carolina del Norte desde 1992 a 2012 (Lobo *et al.*, 2013) en el que se analizó la supervivencia postrasplante en pacientes colonizados previamente por *M. abscessus* (considerada también por algunos una contraindicación para la intervención) que fue del 77% al año, 64% a los tres y 50% a los cinco, predominando los infiltrados pulmonares y/o infecciones de piel y tejidos blandos en el caso de micobacterias no tuberculosas.

Vital *et al.* (2013a) en Suiza desde 1992 a 2009, constataron que la cirugía de los senos y la ducha diaria nasal reducen la colonización por *Pseudomonas* de las vías

aéreas en receptores de trasplante pulmonar. La ausencia de dicha colonización en el postrasplante tuvo un impacto positivo en la supervivencia posterior y el desarrollo del síndrome de bronquiolitis obliterante. Parece ser que una cirugía extensa de los senos paranasales, previa a la cirugía, podría prevenir la infección del nuevo pulmón (Ciofu *et al.*, 2013). En un trabajo realizado con 73 pacientes trasplantados, la infección crónica con *P. aeruginosa* fue un factor de riesgo significativo para el desarrollo de poliposis nasal tras el trasplante (Vital *et al.*, 2013b).

C. difficile se aísla en el 30 al 50% de los pacientes con FQ (más a menudo que en otros grupos de enfermos). En el primer año postrasplante pulmonar, los afectados de FQ, son 2-3 veces más susceptibles de tener diarrea asociada a esta bacteria y colitis, que en personas sin FQ (Theunissen *et al.*, 2008). En un análisis realizado por la Universidad de Minnesota de los trasplantados entre 2000 y 2011 (16.5% de un total de 388 por FQ) se objetivó que los que desarrollaron infección por *C. difficile* tienen mayor riesgo de muerte, especialmente cuando ésta tiene lugar en los primeros seis meses posteriores (Lee *et al.*, 2013). La colitis pseudomembranosa es una causa rara pero clásica, de muerte en receptores de pulmón.

4.7. Infecciones fúngicas en pacientes trasplantados

El número de personas que en nuestro país sufren una infección fúngica al año está en torno a 8,1 millones, la mayoría de piel o mucosas que no causan la muerte. La candidemia es mucho más frecuente que en otros países europeos y se ha incrementado 1,88 veces en la última década (8,1/100.000), la tasa de aspergilosis invasiva se ha estimado en 2,75 / 100.000 y la mucormicosis en 0,04 / 100.000. Se estimarían 419 casos de aspergilosis invasiva anuales en pacientes con cáncer o trasplantados y 208 de PcP en este mismo grupo (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2015).

El espectro de las infecciones fúngicas ha cambiado a lo largo del tiempo, pues inicialmente predominaba la de *Candida* que ha sido sustituida por *Aspergillus* seguido por *Scedosporium* y *Zygomycetes* (nuevos patógenos emergentes). *Cryptococcus neoformans* es otro importante agente responsable de la morbilidad de los trasplantados.

Las infecciones fúngicas en los receptores de pulmones se pueden presentar como invasivas, la manifestación más común seguida de traqueobronquitis.

En el trabajo realizado en Pittsburgh (Pensilvania, EE.UU) (Vadnerkar *et al.*, 2010) se revisó la histopatología de los pulmones explantados de 304 pacientes que recibieron un trasplante entre 2005 y 2007. Se comprobaron infecciones invasivas por hongos en el 5% (14 individuos), de éstos a sólo tres se les había aplicado tratamiento inmunosupresor en el año previo al trasplante, lo que sugiere que la propia patología pulmonar predispone a los pacientes a la infección por hongos; el riesgo de padecerla fue mayor en pacientes con FQ que con otras patologías aunque en el 57% de los enfermos no se diagnosticaron estas complicaciones. A pesar de la profilaxis secundaria con voriconazol, las infecciones fúngicas se desarrollaron en el 43% de los pacientes que tenían hongos en sus pulmones explantados (3 de ellos estaban sometidos a tratamiento profiláctico y otros 3, ocho meses después de la finalización de la aplicación de voriconazol). La mortalidad atribuible a las infecciones fúngicas invasivas entre pacientes con hongos en sus pulmones explantados fue del 29%. Por tanto los autores sugieren que a menudo aquellas no son reconocidas previamente a la intervención y se asocia con peor pronóstico.

La colonización de las vías respiratorias bajas en adultos en el primer año postrasplante, es del 30% al 40% (Helmi *et al.*, 2003) frente al 60% (Liu *et al.*, 2009a) en pacientes pediátricos; sin embargo, su persistencia es similar en ambos grupos, aunque en los niños la existencia previa a la intervención no se asoció con la postoperatoria o con infección y tampoco la colonización postrasplante con el desarrollo de enfermedad pulmonar invasiva.

En un estudio multicéntrico en EE.UU y Europa (Danziger-Isakov *et al.*, 2008) se investigaron 555 pacientes pediátricos trasplantados por FQ y otras causas. En el primer año postrasplante, 62 de ellos tuvieron infección fúngica pulmonar probada o probable poniéndose de manifiesto que esta complicación está asociada o son factores de riesgo, la existencia de una colonización previa a la intervención, la edad por encima de 15 años, la discordancia serológica para CMV, un régimen basado en tacrólimus, ser donante positivo para CMV y rechazo grado A2 y agudo repetido. En la Tabla nº 6 se muestran los organismos responsables de las

infecciones fúngicas pulmonares que tuvieron lugar en el primer año postrasplante.

Tabla nº 6. Patógenos responsables de las infecciones fúngicas pulmonares.

Organism	Number (%)	Mortality due to PFI
<i>Aspergillus</i>	38 patients	9 of 38 (24%)
<i>Aspergillus</i>	23	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	16	
<i>Aspergillus niger</i>	1	
<i>Candida</i>	10 patients	3 of 8 (38%)
<i>Candida</i> species	4	
<i>Candida albicans</i>	6	
<i>Candida krusei</i>	1	
Other	13 patients	0 of 13 (0%)
Fungus	2	
Mold	1	
<i>Mucormycosis</i>	1	
<i>Ochroconis humicola</i>	1	
<i>Paecilomyces</i>	2	
<i>Penicillium</i>	2	
<i>Saccharyomyces</i>	1	
<i>Scedosporium</i>	2	

Tomado de Danziger-Isakov *et al.* (2008).

Según Liu *et al.* (2009a) 14 infecciones fúngicas pulmonares probadas o probables se registraron en 11 pacientes trasplantados, el 91.6% de ellos con FQ. La media de días tras el trasplante para padecer la primera infección fúngica pulmonar fue de 271 (rango de 6 a 925). El análisis univariante reveló un riesgo incrementado de sufrirla si se había aplicado profilaxis para CMV o un episodio previo, pero no se asoció con un riesgo superior de muerte o retrasplante (Liu *et al.*, 2009a). En el modelo univariante, el riesgo de colonización fúngica se asoció con seropositividad del donante para CMV o recibir profilaxis para el mismo, rechazo grado A2 o mayor e infección respiratoria viral previa a la colonización fúngica (Liu *et al.*, 2009a), en tanto que en el multivariante, una edad mayor, profilaxis para CMV e infección respiratoria viral previa a la colonización, se mostraron como predictores independientes de la colonización postrasplante. Tampoco la FQ supuso un riesgo tras el trasplante, y ésta no se asoció con muerte o necesidad de repetirlo.

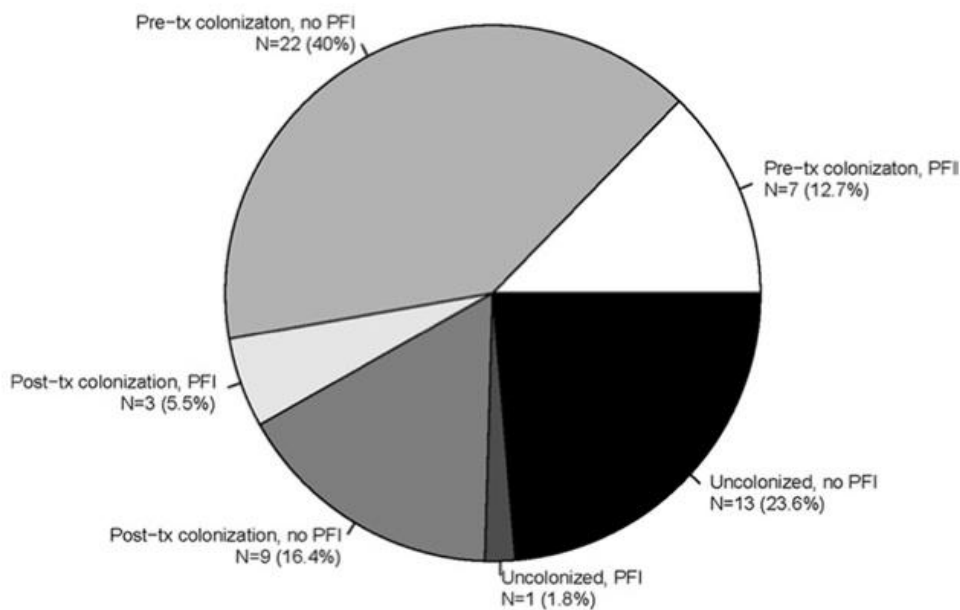
4.7.1. *Candida*

En un análisis retrospectivo llevado a cabo en Cleveland sobre 55 pacientes pediátricos (62% de ellos con FQ) sometidos a trasplante pulmonar entre 2002 y 2007, Liu *et al.* (2009a) observaron que tras la intervención, 33 sujetos tuvieron 73

episodios distintos de colonización fúngica de vías respiratorias bajas (rango entre 1 y 9) mediante estudio del lavado broncoalveolar (LBA) con una mediana de 58 días. *C. albicans* y otras especies de este género fueron las más comunes (en 13 y 9 sujetos respectivamente) aunque también se identificaron especies de *Aspergillus* (en 9, en niños incluso puede ser conjunta) y variedades de otros hongos (en 26), incluyendo *Basidiomycetes*, *Paecilomyces* y *Scedosporium*.

Seis pacientes tuvieron colonización persistente con el mismo microorganismo en dos o más evaluaciones consecutivas (*C. albicans*, *C. glabrata* y *Basidiomycetes*), aunque los colonizados no desarrollaron infección fúngica invasiva a pesar de no estar recibiendo tratamiento preventivo específico (ver Figura nº 7).

Figura nº 7. Colonización e infección fúngica pulmonar.



Los pacientes se dividen según su estado (colonización pretrasplante, de novo postrasplante y no colonizados) y dentro de éstos en función de la presencia o no de infección pulmonar tras el trasplante. Adaptado de Liu *et al.* (2009a).

4.7.2. *Aspergillus*

La colonización previa por *Aspergillus* no se detectó en ningún caso de infección pulmonar fúngica postrasplante (Liu *et al.*, 2009a). Los receptores de pulmones experimentan una alta incidencia de infección por *Aspergillus* en comparación con los de otros órganos sólidos (Iversen *et al.*, 2007), que van desde la colonización a

la traqueobronquitis invasiva, pasando por la invasión pulmonar o la aspergilosis diseminada (Singh & Paterson, 2005). Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la aspergilosis broncopulmonar alérgica, el aspergiloma y la sinusitis. La traqueobronquitis invasiva es especialmente peligrosa en el periodo inmediato (primer mes postoperatorio) ya que puede afectar a la sutura bronquial y a la formación de fístulas entre el bronquio y la arteria pulmonar adyacente. La aspergilosis invasiva tiene una incidencia media del 6% (rango de 3 a 14) con inicio medio a los 120 días (rango de 4 a 1.410). Entre el 15 y el 20% son diseminadas provocando una mortalidad del 68%. En la Tabla nº 7 (Singh & Paterson, 2005) se pueden observar las características epidemiológicas de la aspergilosis invasiva tanto en los trasplantados de pulmón como de otros órganos.

Tabla nº 7. Características epidemiológicas de la aspergilosis invasiva en receptores de trasplante.

Type of transplant	Incidence range, % (mean)	Mean days to onset (range)	% Due to disseminated aspergilosis	% Mortality
Liver	1-8 (2)	17 (6-1,107)	50-60	87
Lung	3-14 (6)	120 (4-1,410)	15-20	68
Heart	1-15 (5.2)	45 (12-365)	20-35	78
Kidney	0-4 (.7)	82 (20-801)	9-36	77
Pancreas	1.1-2.9	NA ^b	NA	100
Small bowel	0-10 (2.2)	289 (10-956)	66	66
Allogeneic stem cell ^c	5-26 (10)	78 (46-120)	27-30	78-92
Autologous stem cell	2-6 (4.8)	20 (7-456)	10-20	78-92
Nonmyeloblastic stem cell	8-23 (11)	107 (4-282)	34	63-67

b: NA, no disponible. c: los datos son de trasplantes alogénicos mieloablativos. Adaptado de Singh *et al.* (2005).

El uso de profilaxis antifúngica ha dado lugar a un retraso de la Aspergilosis invasiva, habiéndose descrito en recientes estudios (Hosseini-Moghaddam & Husain, 2010) una tasa de incidencia acumulada de 2,4% a los 12 meses. La colonización por *Aspergillus* pre o postrasplante junto con infecciones previas por CMV, hipogammaglobulinemia, trasplante unipulmonar, así como el rechazo y la necesidad de aumentar la inmunosupresión se consideran factores de riesgo significativos para la aspergilosis invasiva. La colonización postrasplante también está implicada en el desarrollo del síndrome de bronquiolitis obliterante.

En el estudio retrospectivo realizado en Dinamarca que incluyó 362 pacientes trasplantados entre los años 1992 y 2003 (Iversen *et al.*, 2007), se observó colonización por *Aspergillus* en 83 de ellos y en otros 22 enfermedad invasiva (la mayoría en los tres primeros meses postrasplante) y en los afectados por FQ

asociando la segunda forma con un 58% de mortalidad a los dos años, mientras que la primera era a los 5. Además la edad del donante, el tiempo de isquemia o el uso de daclizumab (versus inducción policlonal) fueron factores de riesgo independientes para la infección.

Helmi *et al.* (2003) en pacientes trasplantados (32 padecían FQ y 101 sin esta afección) comprobaron que de los enfermos del primer grupo el 53% (17/32) estaban colonizados por *A. fumigatus* previamente al trasplante y la continuaron padeciendo después el 59% (10/17) y posteriormente 4 de ellos desarrollaron Aspergilosis traqueobronquial aunque ninguno en forma diseminada o neumonía. Asimismo entre los 15 restantes que no tenían colonización previa por este hongo la padecieron el 40% (6/15) postintervención.

En los del segundo grupo sufrieron este asentamiento fúngico después de la cirugía el 28% (28/101) y además 4 de ellos desarrollaron aspergilosis traqueobronquial y 6 neumonitis, respondiendo al tratamiento con supervivencia a largo plazo sólo 3 de éstos.

En un estudio de cohortes retrospectivo unicéntrico realizado por Luong *et al.* (2014) entre 2006 y 2010 sobre 93 pacientes con FQ trasplantados, se objetivó que 65 tenían colonización por *Aspergillus* previamente. En 36 fue positivo el LBA intraoperatorio en el pulmón nativo. 20 enfermos desarrollaron Aspergilosis invasiva, con una mediana de 42 días tras el trasplante, actuando como factores de riesgo para esta complicación independientes el cultivo positivo intraoperatorio, que supuso un incremento cuádruple y el tratamiento para el rechazo agudo del injerto dentro de los 90 días postcirugía. La profilaxis antifúngica se había administrado a 57 de los 93 receptores. La infección por *Aspergillus* no se asoció con un riesgo incrementado de muerte.

Lázaro *et al.* (2011) revisaron siete casos de endocarditis por *A. fumigatus* (5 de ellos con trasplante pulmonar por FQ). Ninguno tenía una enfermedad valvular previa conocida y el tiempo transcurrido entre la cirugía y el diagnóstico de dicha afección cardiaca fue de 8 ± 6 meses. En todos los casos los hemocultivos fueron negativos y las vegetaciones medían más de 1,5 cm (aunque por ecocardiografía transtorácica no se detectaron éstas en tres de ellos) y cinco pacientes murieron

por enfermedad diseminada.

En el trabajo publicado en 2008 por Silveira *et. al* (2008) realizado entre 1996 y 2006 sobre pacientes trasplantados de pulmón (el 6% de ellos debido a FQ) en los que se aisló un hongo distinto al *Aspergillus* en el LBA, *Cladosporium* fue el más frecuente (Tabla nº 8) con una mediana de 415 días postrasplante. La profilaxis con un agente antifúngico se llevó a cabo en el 44,7% de los pacientes en los que se había aislado durante el seguimiento posterior (mediana 765 días). No hubo casos de infección fúngica invasiva probada en el primer año tras el hallazgo y tan sólo un caso de *Zygomycosis* probable. Estos resultados sugieren que el inicio de la profilaxis antifúngica dirigida, tras el aislamiento en LBA de hongos no *Aspergillus*, puede no estar justificada.

Tabla nº 8. Hongos distintos a *Aspergillus*.

Organism	Number of isolates (percent of total)
<i>Cladosporium</i>	35 (41.2)
<i>Phialemonium</i>	14 (16.5)
<i>Chaetomium</i>	5 (5.9)
Zygomycete ^a	12 (14.1)
<i>Scedosporium apiospermum</i>	4 (4.7)
<i>Scedosporium inflatum</i>	2 (2.4)
<i>Alternaria</i>	4 (4.7)
<i>Bipolaris</i>	3 (3.5)
Other ^b	6 (7.1)

^a*Rhizopus*, 5; *Rhizomucor*, 2; *Mucor*, 3; *Cunninghamella*, 1; *Syncephalastrum*, 1.
^b*Curvularia*, 1; *Dactylaria*, 2; *Graphium*, 1; *Phialophora*, 2.

Tomado de Silveira *et al.* (2008).

4.7.3. *Scedosporium* y otras

Las infecciones emergentes por *S. apiospermum* suponen importantes causas de morbilidad y mortalidad en pacientes trasplantados, alcanzando hasta el 25% de las ocasionadas por hongos filamentosos distintos de *Aspergillus* en los de órganos sólidos (Solé, 2011). Los enfermos de FQ colonizados antes del trasplante y los sometidos a implantación unipulmonar son los que tienen mayor riesgo.

También está descrito un caso de osteomielitis varios años después del trasplante de pulmón y un aneurisma micótico en la aorta abdominal en la misma paciente

(Thomson *et al.*, 2015), así como otros de infección diseminada (Miraldi *et al.*, 2012; Symoens *et al.*, 2006; Solé, 2011) e invasivas por *Scedosporium* letales en pacientes trasplantados por FQ (Morio *et al.*, 2010). El tratamiento de las infecciones por *Scedosporium* o *Zygomycetes* es complicado, ya que presentan una importante resistencia al fármaco de elección (anfotericina B, voriconazol) por lo que tienen una mortalidad de hasta el 80% (Hosseini-Moghaddam & Husain, 2010).

También se han descrito casos de infección diseminada por *Neosartorya pseudofischeri* (Khare *et al.*, 2014) y posible coinfección con *Tyromyces fissilis* (Chrenkova *et al.*, 2015), miositis por *Microsporidia* (*Anncaliia algerae*, previamente *Brachiola algerae*), que son parásitos intracelulares obligados, más cercanos a los hongos que a los protozoos (Field *et al.*, 2012), funguemia por *Microascus cirrosus* (Miossec *et al.*, 2011) y pericarditis por *C. neoformans*.

Las infecciones por *Mucorales* (*Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*) pueden producir infecciones sistémicas letales y crecer en la anastomosis quirúrgica del bronquio causando estenosis. La mortalidad de la mucormicosis pulmonar es del 50 al 70% en los procesos locales y del 95% en los diseminados (Neto *et al.*, 2014).

También se ha publicado la infección fatal diseminada por las levaduras (ampliamente expandidas en la naturaleza) *Trichosporon mycotoxinivorans*, *T. asahii* y *T. mucooides* (éstas últimas se han descrito en pacientes con leucemia y trasplantados de hígado, riñón o corazón) (Hirschi *et al.*, 2012).

4.7.4. *Pneumocystis*

Los trasplantados de órgano sólido tienen un riesgo importante de padecer PcP en el primer año posterior. La colonización pretrasplante es un factor de riesgo añadido para el desarrollo de infecciones en el postrasplante, por lo que dicha situación identificaría a los sujetos en riesgo de desarrollar infecciones por *Pneumocystis*, sobre todo cuando se han descrito casos de PcP a pesar de quimioprofilaxis después del primer año en pacientes trasplantados (García-Morillo, 2006).

En un trabajo (Wang *et al.*, 2012) que revisó 1241 pacientes adultos entre 2001 y 2011 en Canadá, se identificaron 14 casos de PcP (el 35,7% de ellas con trasplante de pulmón). En este trabajo, se indica que el 53% de los afectados con PcP habían recibido previamente una profilaxis con trimetoprim-sulfametoxazol durante 12 meses y sufrieron PcP entre 645 y 1414 días postrasplante, 6 padecieron viremia por CMV entre 59 y 204 días previos a la presentación de la PcP y dos fallecieron por causas directamente relacionadas con las complicaciones de la neumonía.

Aunque clásicamente la profilaxis con cotrimoxazol debe mantenerse un año tras el trasplante, se podría proponer aumentar el periodo de ésta o reconsiderarla de nuevo en situaciones de mayor inmunodepresión, rechazo tardío o si el ámbito epidemiológico así lo aconseja (García-Morillo, 2006).

4.8. Infecciones víricas en pacientes trasplantados

Las infecciones respiratorias víricas se han asociado con rechazo agudo y síndrome de bronquiolitis obliterante (Davis *et al.*, 2010), éste puede tener un inicio agudo o crónico con un curso abrupto o insidioso, siendo muy útil para el diagnóstico el desarrollo de un deterioro prolongado en las tasas de flujo espiratorio durante al menos 3 semanas (Hayes *et al.*, 2012). La prevalencia de las infecciones por VRS tras el trasplante pulmonar es del 20% y se ha descrito también un desarrollo rápido del síndrome de bronquiolitis obliterante agudo y bronquiectasias, a los tres años del trasplante (Hayes *et al.*, 2012).

La infección por CMV debe diferenciarse de la enfermedad por CMV pues ésta conlleva replicación viral y síntomas clínicos (fiebre, mialgias, artralgias), invasión del tejido y daño de órganos. Se manifiesta predominantemente tras el trasplante por la neumonitis, pero también puede dar lugar a hepatitis, gastroenteritis y colitis usándose para el diagnóstico los test serológicos (antígeno de CMV pp65), cuantitativo y PCR (CMV-PCR) de la sangre, LBA o muestras de tejido. Los receptores CMV negativos de pulmones CMV positivos, son los que tienen mayor riesgo, por lo que es aconsejable tratar a los pacientes trasplantados de este órgano cuando son diagnosticados de viremia por CMV asintomática (Kotton *et al.*, 2010).

En un estudio retrospectivo realizado en 14 centros de EE.UU y Europa (Liu *et al.*, 2009b) se incluyeron 576 niños sometidos a trasplante de pulmón y se registraron 101 infecciones respiratorias víricas en 79. De ellos, el 27,8% tenían FQ y el 82,3% habían recibido trasplante de pulmón bilateral de donante cadáver. Los agentes más frecuentemente encontrados fueron *Adenovirus*, *Rhinovirus* y *VRS* (Tabla nº 9).

Tabla nº 9. Virus presentes en el primer año postrasplante.

Virus	N = 101
Adenovirus	25
Rhinovirus	22
Respiratory syncytial virus	21
Parainfluenza	19
Influenza A/B	9
Herpes simplex virus	5
Enteroviruses	4
Varicella	1

Tomado de Liu *et al.* (2009b).

En un modelo multivariante para el tiempo, hasta la primera infección respiratoria viral, se asociaron de forma independiente con el riesgo de infección respiratoria viral una etiología distinta de FQ, edad menor y no haber recibido terapia de inducción, con una disminución de la supervivencia a los 12 meses.

En la universidad de San Pablo de Brasil (Bugano *et al.*, 2010), se revisaron los pacientes trasplantados de pulmón entre 2003 y 2008, incluyendo 47 (48,93%) que padecían FQ. 19 de ellos desarrollaron un evento por CMV (8 infecciones, 7 síndromes y 15 enfermedad) y en 12 se presentaron estos durante la profilaxis. El análisis univariante, confirmó que los eventos se relacionaron con mayor mortalidad (especialmente si el paciente experimentó más de dos y si el primero ocurrió en los tres meses siguientes al trasplante), pues los que los padecieron después de estos 90 días mostraron la misma supervivencia que los que no los tuvieron.

Las infecciones por *Adenovirus* son más frecuentes en el primer año postrasplante, causando principalmente la muerte, el fallo respiratorio y la hepatitis. El

diagnóstico debe establecerse en esputo o LBA mediante PCR, que es más sensible y rápido que los cultivos virales. Se ha descrito un caso de neumonía necrotizante bilateral con hemorragia alveolar difusa originada por estos virus, cuatro años después del trasplante pulmonar bilateral (Mayeur *et al.*, 2012).

Por ello, un diagnóstico temprano y un tratamiento adecuado, son fundamentales durante las épocas de gripe en este tipo de pacientes (Bresci *et al.*, 2010).

Finalmente se ha constatado un caso de Trichodysplasia spinulosa en una niña a los 3 años del trasplante pulmonar por FQ. Es una entidad rara, probablemente mediada por una infección viral (*Polyomavirus*), del que hay escasas referencias en la literatura (Berk, Lu, & Bayliss, 2013).

5. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES

5.1. Muestras

El material usado para el diagnóstico etiológico de las infecciones es variado: esputo, lavado orofaríngeo (LOF) y LBA obtenido mediante fibrobroncoscopia.

En el trabajo llevado a cabo por Delhaes *et al.* (2012), las muestras de esputo se obtuvieron mediante expectoración en un bote estéril tras un enjuague con agua para prevenir una excesiva contaminación bacteriana. En el estudio realizado por Guss *et al.* (2011) las muestras de esputo se ponían en hielo hasta su examen en la hora siguiente a la obtención de las mismas. Cada toma era lavada tres veces en 20 ml de una solución salina estéril tamponada con fosfato con pH de 7,2 para remover la saliva contaminante. Sibley *et al.* (2011) analizaron los esputos obtenidos tras fisioterapia respiratoria al igual que en el trabajo de Van Daele *et al.* (2005) para asegurar que las mismas provenían de las vías respiratorias bajas.

El LOF (enjuague de la boca y gargarismos con suero salino) fue utilizado por primera vez por Wakefield *et al.* (1993) en 1993 en pacientes con PcP. Ghannoum *et al.* (2010) analizaron la microbiota en individuos sanos utilizando el LOF porque: es relativamente fácil de obtener, es un método no invasivo, la cavidad oral es la mayor puerta de entrada para los microorganismos en el cuerpo y el enjuague permite la recogida de los organismos presentes en el dorso de la lengua y en la mucosa oral. Los LOF fueron recogidos al menos una hora después de haber

comido, aproximadamente a la misma hora (9-11 am), para evitar la contaminación de las muestras y estandarizar el posible impacto de las variaciones en las tasas de flujo salival. Los participantes hicieron gárgaras con 15 ml de solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS) durante 1 minuto, y depositaron el contenido de la boca en un tubo de centrifugado de 50 mL.

Según un trabajo que analizó la microbiota presente en el tejido pulmonar de un niño al que se le realizó una lobectomía por enfermedad grave localizada, los hallazgos de un enjuague orofaríngeo representaron pobremente la microbiota pulmonar (Brown *et al.*, 2014). Según Matos *et al.* (2001), el LOF fue menos útil que el esputo para detectar *P. jirovecii* en pacientes con neumonía con baja carga parasitaria o con infecciones subclínicas, e indican que son necesarios más estudios que evalúen distintos protocolos de PCR, para detectar colonizaciones asintomáticas usando este tipo de muestras, ya que es poco invasiva.

Liu *et al.* (2009a) analizaron la colonización fúngica en LBA en pacientes pediátricos trasplantados pulmonares (el 62% de ellos por FQ) para lo que se llevaron a cabo broncoscopias de vigilancia a las 2 y 6 semanas y a los 3, 6, 9, 12 y 18 meses tras el trasplante. Silveira *et al.* (2008) revisaron retrospectivamente los LBA de pacientes adultos trasplantados de pulmón (el 6% de ellos por FQ) en los que se aisló un hongo distinto al *Aspergillus*. Pederiva *et al.* estudiaron la presencia de *P. jirovecii* en LBA obtenido mediante fibrobroncoscopia diagnóstica (Pederiva *et al.*, 2012).

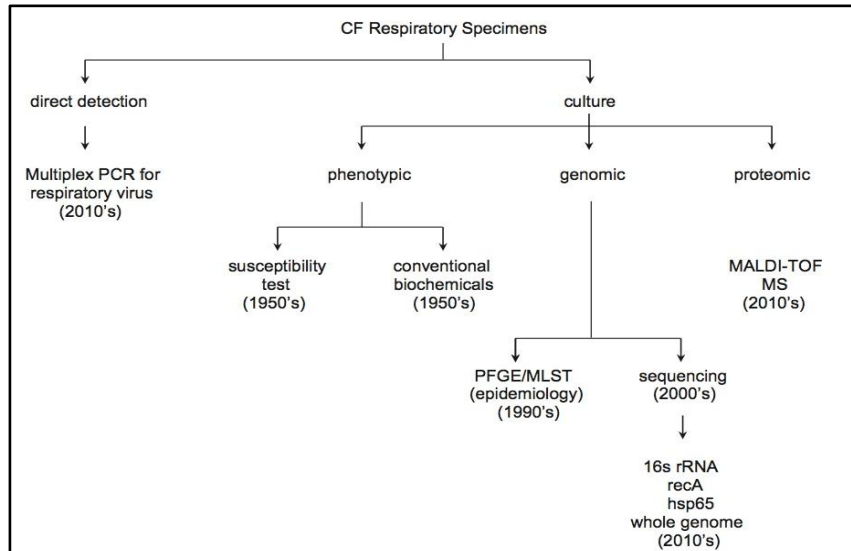
Respaldiza *et al.* (2006) analizaron la utilidad de los lavados orofaríngeos (LOF) para identificar los portadores de *P. jirovecii* por PCR en este tipo de muestras tomadas en pacientes sin PcP, y encontraron una concordancia del 84,4% con los resultados de las investigaciones del agente en esputos y del 80% en LBA, procedentes de los mismos enfermos.

5.2. Metodología

Las técnicas diagnósticas han evolucionando desde los métodos clásicos de tinción y cultivo, hasta las de biología molecular, lo que está permitiendo descubrir la naturaleza polimicrobiana de estas infecciones.

En la Figura nº 8 se exponen resumidamente las empleadas en los últimos 50 años.

Figura nº 8. Métodos diagnósticos utilizados en las infecciones pulmonares en fibrosis quística desde 1950 a 2010.

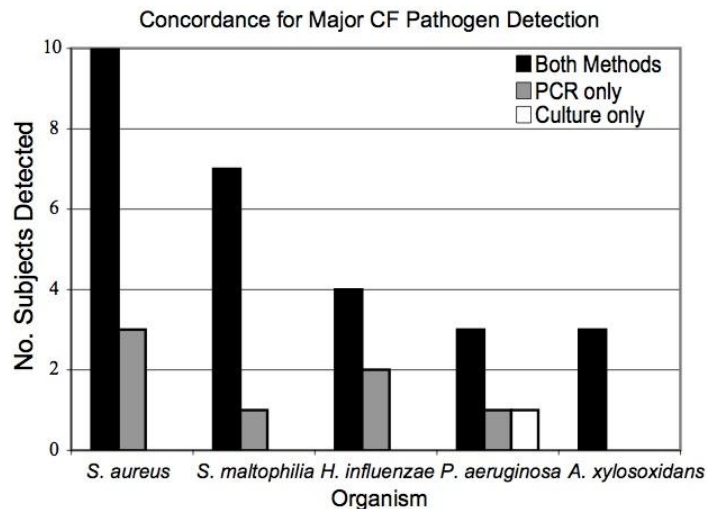


Tomado de Gilligan *et al.* (2014).

5.2.1. Estudio de la microbiota

Harris *et al.* (2007) realizaron un trabajo para identificar la población bacteriana mediante análisis secuencial de ARN-ribosómico en el LBA de 42 niños (28 de ellos con FQ) y se detectaron 4530 clones en los afectados por FQ frente a 1762 en los otros. En la Figura nº 9 se muestran los patógenos más frecuentemente encontrados.

Figura nº 9. Patógenos bacterianos más importantes detectados por cultivo y análisis molecular (con todos los primers bacterianos).



Las barras negras representan la detección por ambos métodos, las grises por los moleculares y las vacías por los cultivables. Tomado de Harris *et al.* (2007).

En Southern Alberta Cystic Fibrosis Clinic (Canadá), durante los últimos 28 años se han llevado a cabo 19.250 aislamientos bacterianos mediante métodos de cultivo (Sibley *et al.*, 2011). Durante cuatro años, en la misma clínica, se identificaron 2.015 aislamientos usando una parte del gen 16S RNA. Sibley *et al.* (2011) analizaron muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística haciendo uso de técnicas de cultivo enriquecidas y fueron capaces de identificar 43 de las 48 familias detectadas por secuenciación (éstas cinco encontradas sólo por métodos de no cultivo, estaban presentes en muy poca cantidad, <0,002 % del total), afirmando que empleando 20 condiciones de cultivo por muestra (la mitad de las cuales incluyen métodos anaerobios y larga incubación), la mayoría de las especies pueden ser identificadas.

Delhaes *et al.* (2012) realizaron un estudio de la microbiota en 8 muestras de esputo de cuatro pacientes adultos con fibrosis quística, mediante cultivos microbiológicos convencionales (Tabla nº 10) y pirosecuenciación del gen 16S rRNA (Tabla nº 11), encontrándose *Pseudomonas* en 5 de las 8 muestras y *Streptococcus* en todas menos una. Se observó una diversidad bacteriana significativamente menor en los pacientes con función pulmonar disminuída y peor estatus clínico.

Tabla nº 10. Aislamientos microbiológicos en esputos mediante cultivo convencional.

Patient- sample	Bacteria
Patient 1-sample 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (mucoïd texture) <i>Alkaligenes xylosoxidans</i>
Patient 1-sample 2	<i>P. aeruginosa</i> (mucoïd texture)
Patient 2-sample 1	ND ^d
Patient 2-sample 2	<i>Haemophilus influenzae</i>
Patient 3-sample 1	<i>Staphylococcus aureus</i> (sensitive to meticillin)
Patient 3-sample 2	<i>S. aureus</i> (sensitive to meticillin)
Patient 4-sample 1	<i>P. aeruginosa</i> (mucoïd texture)
Patient 4-sample 2	<i>P. aeruginosa</i> (non-mucoïd texture) <i>P. aeruginosa</i> (mucoïd texture)

^dND: no realizado. Tomado de Delhaes *et al.* (2012).

Tabla nº 11. Número de lecturas de pirosecuenciación de 16S asignados a cada grupo taxonómico de bacterias.

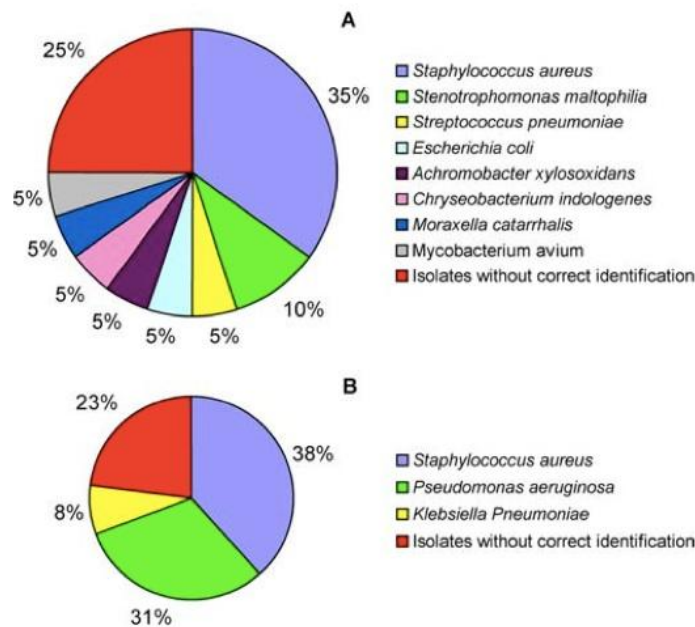
Identification	Sequences (reads) ^a per patient and per sample							
	Patient 1		Patient 2		Patient 3		Patient 4	
	Sample1	Sample2	Sample1	Sample2	Sample1	Sample2	Sample1	Sample2
ACTINOBACTERIA								
Actinomycetales	0	7	17	10	0	0	0	0
Actinomyces	6	11	47	44	32	0	0	0
Rothia	0	0	458	158	15	0	0	0
Atopobium	0	0	9	0	0	0	0	0
BACTEROIDETES								
Bacteroidales	0	0	10	7	0	0	0	0
Porphyromonas	0	0	145	0	0	29	0	0
Prevotellaceae	0	0	15	15	27	14	0	0
Prevotella	98	8	784	2098	620	11	10	0
FIRMICUTES								
Bacilli	0	0	32	0	17	0	0	0
Bacillales	0	0	5	0	0	0	0	0
Gemella	0	0	113	22	79	0	10	0
Lactobacillales	0	0	12	16	9	0	0	0
Enterococcus	0	0	40	10	30	0	0	0
Streptococcus	5	7	255	931	446	5	6	0
Clostridia	0	0	0	0	0	0	0	0
Clostridiales	0	0	11	39	35	0	0	0
Mogibacterium	0	0	6	0	0	0	0	0
Eubacterium	0	0	0	0	11	0	0	0
Catonella	0	0	0	0	18	0	0	0
Veillonellaceae	0	0	0	8	0	0	0	0
Megasphaera	0	0	7	33	0	0	0	0
Veillonella	8	6	63	236	104	6	0	0
FUSOBACTERIA								
Fusobacterium	0	0	46	19	6	5	0	0
Leptotrichia	0	0	0	5	5	0	0	0
PROTEOBACTERIA								
Betaproteobacteria	47	41	30	19	6	51	50	67
Betaproteobacteria	6	7	0	0	0	0	0	0
Alcaligenaceae	6	0	0	0	0	0	0	0
Neisseriaceae	0	0	0	0	14	0	0	0
Neisseria	0	0	35	15	0	5	0	16
Campylobacter	0	0	6	7	118	0	0	0
Gammaproteobacteria	1349	4622	68	9	0	5370	1303	1666
Pasteurellaceae	0	0	255	83	0	11	0	0
Haemophilus	0	0	124	5476	0	5	5	0
Moraxella	0	0	74	0	0	0	0	0
Pseudomonas	5851	230	0	0	0	833	6744	8298
Stenotrophomonas	0	0	0	0	0	5	0	0

^aUna vez que una lectura se asignó al más alto nivel taxonómico, no se añadió en el siguiente nivel taxonómico. Tomado de Delhaes *et al.* (2012).

En 2008 Bittar *et al.* (2008) compararon, en esputos de 25 pacientes con FQ, la eficacia de los métodos de cultivo microbiológicos (Agar chocolate vitex, Agar Columbia colistina – ácido nalidíxico, Agar Mc Conkey, Agar sangre y Agar Cepacia), y de identificación (tinción Gram, bioquímicas sistemas API y Vitek-2 y de susceptibilidad antibiótica) con las técnicas moleculares de extracción de ADN (mediante MagNa Pure LC-Roche), amplificación genómica de 1000 pares de bases (gen 16S rRNA con los primers 536F [59- CAGCAGCCGCGGTAATAC] y rp2 [59-

ACGGC- TACCTTGTTACGACTT]) y realización de la PCR (Nucleo - FastH 96 PCR Kit), clonación (usando pGEMH -T Easy Vector System 2 Kit - Promega) y secuenciación (sistema Applied Biosystem USA, mediante Big DyeH Terminator V1,1 y Cycle Sequencing Kit primers M13d and M13r).

Figura nº 10. Géneros bacterianos identificados mediante métodos de cultivo convencional en niños (A) y adultos (B).



Tomado de Bittar *et al.* (2008).

Mediante metodologías de cultivo consiguieron 33 aislamientos (13 especies bacterianas) implicadas en patologías de FQ, *S. pneumoniae* en el 5% de los niños y *P. aeruginosa* en el 31% de los adultos (Figura nº 10). Por técnicas moleculares, se secuenciaron 760 clones y 53 especies bacterianas diferentes. Se analizaron 736 secuencias bacterianas y se compararon con la base de datos del banco de genes, excepto 11 de ellos que se pueden considerar como no descritas hasta ahora en humanos o emergentes: cuatro *S. pneumoniae*, tres *Streptococcus constellatus*, dos *S. iniae*, un *H. influenzae* y un *A. xylosoxidans*. La media de especies bacterianas encontradas por esputo fue de $7,2 \pm 3,9$ (en adultos $7,2 \pm 4,7$ y en niños $7,2 \pm 3,5$) y de las 53 halladas, 9 se habían ya publicado como patógenas en FQ, 16 anaerobias y el resto son bacterias de la flora oral o detectadas en infecciones endo o periodónticas o de patogenicidad desconocida (Tabla nº 12). Se observaron discrepancias entre los métodos de cultivo y los moleculares (Bittar *et al.*, 2008).

Tabla nº 12. Diversidad bacteriana identificada mediante técnicas moleculares.

Pathogen species	No. of clones	Other species	No. of clones
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> *	9	<i>Abiotrophia defectiva</i> *	1
<i>Burkholderia multivorans</i> *	11	<i>Actinomyces</i> sp.*	2
<i>Haemophilus influenzae</i> *	7	<i>Bergeyella</i> sp.†	1
<i>Moraxella catarrhalis</i> †	20	<i>Capnocytophaga</i> sp.*	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	99	<i>Carnobacterium</i> sp.†	4
<i>Serratia marcescens</i> †	3	<i>Dolosigranulum pigrum</i> †	8
<i>Staphylococcus aureus</i> *	129	<i>Eikenella corrodens</i> *†	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> *	41	<i>Escherichia coli</i> †	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> *	25	<i>Gemella haemolysans</i> *†	20
Total (%)	344 (46.7%)	<i>Gemella sanguinis</i> *	2
		<i>Granulicatella adiacens</i> *	5
Anaerobic species	No. of clones	<i>Granulicatella paradiacens</i> *	17
<i>Dialister pneumosintes</i> *†	1	<i>Kingella denitrificans</i> *†	1
<i>Gemella morbillorum</i> *†	4	<i>Kingella oralis</i> *†	2
<i>Lachnospiraceae genomsp.</i> *†	2	<i>Lactobacillus delbruekii</i> *†	1
<i>Peptostreptococcus</i> sp.*	1	<i>Neisseria</i> sp.*	33
<i>Porphyromonas</i> sp.*	20	<i>Rothia mucilaginosa</i> *	4
<i>Prevotella denticola</i> *	6	<i>Streptococcus anginosus</i> *	5
<i>Prevotella melaninogenica</i> *	12	<i>Streptococcus constellatus</i> *†	3
<i>Prevotella oris</i> *	2	<i>Streptococcus cristatus</i> *	1
<i>Prevotella salivae</i> *	1	<i>Streptococcus genomsp.</i> *	24
<i>Prevotella</i> sp.*	37	<i>Streptococcus gordonii</i> †	4
<i>Selenomonas infelix</i> *†	2	<i>Streptococcus iniae</i> †	2
<i>Selenomonas noxia</i> *†	1	<i>Streptococcus mitis</i> *	13
<i>Selenomonas</i> sp.*	4	<i>Streptococcus parasanguis</i> *	10
<i>Tannerella forsythensis</i> *†	2	<i>Streptococcus salivarius</i> *	20
<i>Veillonella atypica</i> *	1	<i>Streptococcus sanguinis</i> *	2
<i>Veillonella</i> sp.*	23	<i>Streptococcus</i> sp.*	83
Total (%)	119 (16.2%)	Total (%)	273 (37.1%)

*Especies que han sido detectadas en flora oral normal, infecciones endodónticas o periodónticas, neumonía asociada a ventilación o muestras de FQ usando T-RFLP o clonación. †Especies detectadas por primera vez en este estudio en muestras respiratorias de fibrosis quística mediante clonación. Tomado de Bittar *et al.* (2008).

En este trabajo (Bittar *et al.*, 2008), se detectaron bacterias no descritas o muy raramente descritas hasta ahora en pacientes con FQ incluyendo *Dolosigranulum pigrum* y *Dialister pneumosintes*. La compleja comunidad microbiana del esputo de enfermos de FQ, especialmente las bacterias anaerobias, están probablemente infraestimadas como causa patogénica en el pulmón de FQ.

Deschaght *et al.* (2009) compararon la sensibilidad de distintas técnicas diagnósticas (tres de cultivo, cinco de extracción de ADN, dos de PCR convencional y cuatro de PCR a tiempo real) para la identificación de *P. aeruginosa* en esputos de pacientes con FQ, pero no encontraron diferencias entre el cultivo microbiológico y la extracción optimizada del ADN y PCR a tiempo real. Estos resultados indican la importancia que tiene ajustar el protocolo de extracción del ADN y el formato de PCR.

5.2.2. Estudio de la micobiota

Delhaes *et al.* (2012) analizan también la micobiota presente en el esputo de pacientes adultos con FQ. En la Tabla nº 13 se recogen los aislamientos fúngicos hallados mediante cultivo así como la detección molecular de *P.jirovecii* y *A. fumigatus* (mediante PCR anidada y PCR a tiempo real respectivamente). Por pirosecuenciación del locus genético ITS2 se puso de manifiesto la presencia de comunidades fúngicas complejas que habitan en estos pacientes (Tabla nº 14). Se observó *Candida* en 7 de las 8 muestras y *Aspergillus* en 4 de las 8 muestras por métodos de cultivo y por pirosecuenciación. Al igual que se comentó en el apartado previo, la diversidad de la micobiota es menor a medida que disminuye la función pulmonar o empeora el estatus clínico.

Tabla nº 13. Aislamientos fúngicos y detección de *P. jirovecii* y *A. fumigatus*.

Patient- sample	Mycological culture		Molecular analysis	
	DE ^a	Fungi	Nested PCR ^b	rt-PCR ^c
Patient 1-sample 1	0	<i>Candida albicans</i> <i>Geotrichum sp</i>	–	–
Patient 1-sample 2	0	<i>C. albicans</i>	+	–
Patient 2-sample 1	0	<i>C. albicans</i>	+	+
Patient 2-sample 2	0	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>C. albicans</i>	+	+
Patient 3-sample 1	0	<i>A. fumigatus</i> <i>Aspergillus flavus</i>	–	+
Patient 3-sample 2	PH,H ^e	<i>A. fumigatus</i> <i>C. albicans</i>	–	+
Patient 4-sample 1	0	<i>C. albicans</i>	+	–
Patient 4-sample 2	H	<i>C. albicans</i> <i>A. fumigatus</i>	–	+

^aDE: examen directo; ^bNested PCR: PCR anidada para identificar colonización por *P. jirovecii*; ^crt-PCR: PCR a tiempo real para detección de *A. fumigatus*. ^ePH: Pseudo-hyphae, H: hyphae. Tomado de Delhaes *et al.* (2012).

Sing *et al.* (2001) investigan mediante PCR anidada la presencia de *P. jirovecii* en 137 muestras de esputos de 95 pacientes con FQ, que no habían recibido tratamiento previo con trimetoprim-sulfametoxazol. Dieron positivos 7 de los 95 (7,4%) mientras que ninguno por tinciones con Giemsa y Grocott-plata. En esta misma línea, Varela *et al.* (1998) no encontraron *Pneumocystis* en 45 afectados por FQ usando distintos métodos tintoriales (azul de toluidina O, Giemsa modificado, metenamina-plata e inmunofluorescencia), sin embargo el mismo grupo publicó en

2003 una prevalencia del 18,8% (Varela *et al.*, 2004) mediante el uso de herramientas de biología molecular.

Tabla nº 14. Número de lecturas de pirosecuenciación de ITS asignados a cada grupo taxonómico de hongos.

Identification	Sequences (reads) ^a per patient and per sample							
	Patient 1		Patient 2		Patient 3		Patient 4	
	Sample1	Sample 2	Sample1	Sample2	Sample1	Sample2	Sample1	Sample2
DIKARYA	9	7	36	14	10	2	52	18
ASCOMYCOTA	0	14	31	26	18	50	5	12
Saccharomyceta	6	257	129	199	7	4	38	107
Pezizomycotina	0	0	1	0	0	2	0	1
Leotiomyceta	1	1	1722	216	89	188	0	104
Dothideomycetes	0	1	10	7	0	0	0	0
Cryptococcus	0	0	0	0	0	0	0	145
Didymella	0	117	0	0	0	0	0	0
Phaeosphaeria	0	0	7	0	0	0	0	0
Eurotiomycetes	0	0	18	0	0	0	0	0
Eurotiomycetidae	0	0	4	0	3	7	0	0
Eurotiales	0	0	0	1	3	5	0	1
Trichocomaceae	0	0	120	462	1108	2661	0	129
Eurotium	0	0	13	0	0	0	0	0
Mitosporic Trichocomaceae	0	0	9	5	6	2	0	4
Aspergillus	0	0	403	0	13	8	0	15
Penicillium	0	0	25	306	0	0	0	0
Neosartorya	0	0	0	557	1887	5179	0	239
Sordariomyceta	0	0	2	0	0	0	0	0
Helotiales	0	0	9	0	0	0	0	0
Chalara	0	0	17	0	0	0	0	0
Sclerotiniaceae	0	0	0	69	0	0	0	0
Sordariomycetes	8	0	0	7	0	0	0	0
Hypocreales	4	0	0	0	0	0	0	0
Nectria	16	0	0	0	0	0	0	0
Xylariales	0	0	0	0	1	0	0	0
Phyalospora	0	0	0	0	5	12	0	0
Saccharomycetes	0	0	1	0	0	0	3330	0
Saccharomycetales	9	60	92	60	198	0	808	116
Dipodascaceae	11	0	0	10	0	0	0	0
Clavispora	0	0	139	0	0	0	0	0
Candida	202	8688	5126	7167	6078	0	1173	6916
Saccharomycetaceae	12	0	4	0	0	0	398	0
Kluyveromyces	483	0	0	0	0	0	0	0
Saccharomyces	0	0	0	0	0	0	8	0
Torulaspora	0	0	20	0	0	0	0	0
BASIDIOMYCOTA	1	0	104	29	0	0	2	74
Agaricomycotina	0	0	13	1	0	0	2	5
Agaricomycetes	0	0	477	16	0	0	58	20
Hyphodontia	0	0	0	0	0	0	488	0
Coriolaceae	0	0	2	0	0	0	0	0
Piptoporus	0	0	103	30	0	0	0	0
Phlebiopsis	0	0	0	0	0	0	0	42
Russulales	0	0	1	0	0	0	0	0
Peniophora	0	0	204	0	0	0	0	0
Stereum	0	0	33	0	0	0	0	0
Agaricomycetidae	0	0	2	0	0	0	0	0
Agaricales	0	0	2	0	0	0	0	0
Physalacriaceae	0	0	1	0	0	0	0	0
Strobilurus	0	0	6	0	0	0	0	0
Tremellomycetes	0	0	91	0	0	0	0	0
Dioszegia	0	0	129	0	0	0	0	0
Sporobolomyces	0	0	7	0	0	0	0	0
Microbotryomycetes	0	0	1	2	0	0	4	0
Sporidiobolales	0	0	11	5	0	0	52	0
Sporobolomyces	0	0	0	0	0	0	8	0
Ustilaginomycotina	9	0	8	14	0	10	0	3
Entylomataceae	0	0	2	0	0	0	0	0
Entyloma	0	0	73	0	0	0	0	0
Malassezia	473	0	201	302	0	338	0	75
Microstromatales	0	0	0	0	0	0	0	9
Quambalaria	0	0	0	0	0	0	0	14

^aUna vez que una lectura se asignó al más alto nivel taxonómico, no se añadió en el siguiente nivel taxonómico. Tomado de Delhaes *et al.* (2012).

La microscopía de fluorescencia con anticuerpos monoclonales es útil para detectar *P. jirovecii* en muestras de esputo inducido (Elvin *et al.*, 1988) por lo que la PCR es preferentemente utilizada en esputo y LBA cuando contienen sólo un pequeño número de estos microorganismos (Durand-Joly *et al.*, 2005). En el trabajo de Respaldiza *et al.* (2006), la PCR anidada en LOF de pacientes colonizados, tuvo una sensibilidad del 95,6% y especificidad del 87,5%, teniendo como referencia los resultados obtenidos con esta técnica en esputo o LBA.

Para la investigación de *Aspergillus* se han utilizado diversas técnicas (Singh & Paterson, 2005):

- Detección del nivel del polisacárido de la pared celular (galactomannan) en la circulación, mientras que el hongo crece en los tejidos, mediante: Test de aglutinación-látex (15 ng/ml), Radioinmunoensayo (10 ng/ml), ELISA-Inhibición (4-5 ng/ml) y ELISA-Doble sándwich (0,5 ng/ml).
- Método colorimétrico de detección de (1→3)-β-D-glucano (GlucateLL) y turbidométrico (Fungitec-G).
- PCR para buscar el ADN fúngico (que es 19,4 veces más sensible que los métodos de cultivo).

5.2.3. Niveles séricos de betaglucano.

La detección de betaglucano en suero se ha propuesto como muy útil para el diagnóstico de las infecciones fúngicas invasivas (los géneros *Mucor* y *Rizopus* no poseen este polisacárido) y se ha evaluado en pacientes con cáncer y controles sanos.

En un trabajo realizado por Alexander *et al.* (2010) sobre 73 trasplantados de pulmón se estudiaron 756 sueros de 59 de ellos sin infección fúngica invasiva y 41 de 14 pacientes con esta patología (probada o probable). El 92% de los no afectados de infección fúngica invasiva mantuvieron al menos una cifra de betaglucano superior a 60 pg/ml (establecida previamente como nivel mínimo para diagnóstico positivo) y el 90% de ellos al menos 80 pg/ml.

Los organismos presentes en estos pacientes fueron: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *Hyaline hyphomycete*,

Penicilium sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Malbranchea* y *Rhinochrysiella aquaspersa*.

Estar recibiendo terapia antifúngica concomitante puede ser causa de falsos negativos y entre las que ocasionan falsos positivos están; ser el betaglucano ubicuo, mala manipulación, hemodiálisis con membranas de celulosa, exposición a material quirúrgico (gasas), bacteriemia, reciente administración de albúmina, uso de productos con inmunoglobulinas, tratamiento intravenoso con un inhibidor de betalactámico (amoxicilina-clavulánico o piperacilina-tazobactam) y colonización respiratoria por mohos. Según este trabajo (Alexander *et al.*, 2010), la exactitud del test es marginal y su utilización, como herramienta para el diagnóstico temprano de la infección fúngica invasiva, es cuestionable en los trasplantados pulmonares.

Por el contrario, en otro trabajo realizado en EE.UU (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2005) en el que determinan los niveles de betaglucano mediante el test Fungitell® en 163 pacientes con infección fúngica invasiva (probada o probable) y 170 sin esta afección (todos ellos con diferentes tipos de enfermedad de base y algunos receptores de órgano sólido) concluye que ésta es una buena técnica diagnóstica (fijando un nivel de positividad entre 60 y 80 pg/ml). Los agentes reponsables de infección probada fueron: *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. y *Cryptococcus* sp. y entre los agentes causales de enfermedad probable estaban *Candida* y *Aspergillus*.

Por otra parte, *Alcaligenes faecalis* y *S. pneumoniae* son productores de (1→3)-β-D-glucano y más recientemente se ha publicado que la bacteriemia por *P.aeruginosa* también eleva los niveles de (1→3)-β-D-glucano, por tanto la presencia de infección bacteriana concomitante por estos microorganismos puede ser causa de falsos positivos para infección fúngica invasiva (Mennink-Kersten, Ruegebrink, & Verweij, 2008).

Un trabajo (Chryssanthou *et al.*, 1999) llevado a cabo en pacientes trasplantados de médula ósea y de órgano sólido (excepto pulmón) reveló una concordancia entre la detección de betaglucano y PCR del 56% y de un 60% con el ratio D/L-arabinitol en el diagnóstico de infección invasiva por *Cándida* sp., sugiriendo que es necesaria la combinación de varias técnicas de no cultivo para el diagnóstico de

estas enfermedades.

Se ha visto que los betaglucanos presentes en las hifas fúngicas inducen una marcada respuesta inflamatoria en las células de las vías respiratorias que se exponen a ellas (Bellanger *et al.*, 2011). Los (1→3)-β-D-glucano son modificadores de la respuesta biológica con potentes efectos en el sistema inmune. Su receptor humano es del Tipo II transmembrana, con un dominio carbohidrato extracelular de reconocimiento y un inmunorreceptor en su cola citoplasmática, activado por tirosina y que es capaz de reconocer varios (1→3)-β-D-glucanoy 1-6-β-D-glucanos así como levaduras intactas. También se une a los linfocitos T en un sitio distinto a los betaglucanos, por lo que puede reconocer ligandos endógenos y exógenos (Willment, Gordon, & Brown, 2001). Hohl *et al.* (2005) sugieren que los pulmones de los mamíferos han desarrollado un mecanismo para distinguir esporas de especies potencialmente mortales de otras latentes o inocuas.

Por otra parte, para detectar especies del complejo *Scedosporium* y *Pseudallescheria*, en muestras respiratorias de pacientes con FQ, en los que se sospeche infección fúngica o vaya a plantearse trasplante pulmonar, debería utilizarse un medio semiselectivo (agar SceSel+). También se han descrito otras técnicas diagnósticas como la tomografía de emisión de positrones (PET) con fluorodeoxiglucosa [¹⁸F] para el diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas. Se ha publicado también que N (α)-methyl coprogen B puede ser un marcador de colonización de las especies del complejo de *S. apiospermum* en las vías aéreas de pacientes con FQ.

En un estudio monocéntrico y prospectivo en Francia (en el que participó un paciente con FQ y ningún trasplantado pulmonar) (Hot *et al.*, 2011) se observó una captación aumentada de ¹⁸F en todas las áreas previamente identificadas por tomografía axial computerizada (TAC) o resonancia magnética nuclear (RMN), como afectadas por infección fúngica. Por tanto, el PET con [¹⁸F] podría ser potencialmente útil para el diagnóstico inicial y el estadiaje de estos procesos.

6. TRATAMIENTO

La modificación de la ecología donde asientan las bacterias, podría ser una vía para favorecer la eficacia del tratamiento de las infecciones crónicas.

En las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Fibrosis Quística publicadas en 2014 (Smyth *et al.*, 2014) se recogen una serie de publicaciones de referencia para el manejo de esta enfermedad.

6.1. Tratamiento farmacológico de la fibrosis quística

6.1.1. Moduladores del Regulador de la Conductancia Transmembrana en fibrosis quística (CFTR):

Las “bypass therapies” como el uso de las anoctaminas, tienen como objeto modificar la conductancia de otros iones no dependientes de CFTR. Esto será útil independientemente de la mutación que tenga el paciente (Kunzelmann *et al.*, 2011).

La FQ se trata de una enfermedad monogénica que está influenciada por un gran número de genes diferentes y rutas biológicas así como de factores medioambientales. Además, no es fácil predecir un fenotipo clínico a partir de las variaciones genéticas. Entre los moduladores de CFTR se dispone de:

6.1.1.1. Agentes de clase I.

Se propuso el uso de aminoglucósidos, gentamicina y tobramicina, drogas que leen a través del ribosoma: Ataluren (PTC124), actúa sobre éste y permite generar una proteína CFTR funcional. Ha sido estudiada pero no se ha visto mejoría en la función pulmonar (Kerem *et al.*, 2014). No está aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) aunque se usa bajo autorización en algunos pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

6.1.1.2. Potenciadores para las mutaciones de clase III y IV: Ivacaftor (VX-770).

Disponible como Kalydeco[®] para pacientes con la mutación Gly551Asp (G551D). Incrementa el tiempo que los canales CFTR permanecen abiertos en la superficie celular y produce aumentos en el VEF1, ganancia de peso significativa y descenso

de cloro en el sudor (Kumar *et al.*, 2014). En pacientes de más edad, ha demostrado también una reducción en la tasa de exacerbación y una mejoría de la calidad de vida.

Más recientemente, la FDA aprobó el uso de Ivacaftor para otras 8 mutaciones que junto con G551D constituyen el 5% de todos los pacientes con FQ. Está siendo probado ahora en otras mutaciones de las clases III y IV (R117H) y también parece ser beneficiosa en las V, aunque se requieren más estudios. Un ensayo Fase II con VX-661 e Ivacaftor mostró un modesto pero significativo cambio en los niveles de cloro en el sudor así como una pequeña, variable y significativa mejoría en la función pulmonar en los pacientes con F508del-homocigotos (Amaral, 2015). Existen otros potenciadores como la genisteína y otros flavonoides relacionados (Illek *et al.*, 1999).

6.1.1.3. Correctores para las mutaciones de clase II: Lumacaftor (VX-809).

Permite a dF508 CFTR evitar la degradación proteómica e incrementar el tráfico de la proteína a la superficie celular epitelial. Promueve una reducción significativa de cloro en el sudor, sin efectos en la función pulmonar en la Fase II de un ensayo clínico (Clancy *et al.*, 2012).

En combinación con ivacaftor proporciona un beneficio para los pacientes con FQ homocigotos para la mutación Phe508del CFTR (Wainwright *et al.*, 2015).

Actualmente los tres están siendo testados pero la efectividad de los correctores en pacientes con sólo un alelo F508del, es probablemente menor que en los homocigotos (y sólo aproximadamente el 40% de los pacientes son homocigotos para F508del). La corrección de las mutaciones de clase II podría cambiar el curso clínico del 90% de los afectados por FQ (Pittman & Ferkol, 2015).

6.1.1.4. Activadores de la señalización de Rac 1.

Rac 1 es uno de los estabilizadores que promueve el anclaje al citoesqueleto de actina vía NHERF1 (Moniz *et al.*, 2013).

En la Figura nº 11 se muestran las estrategias y tipos de moléculas necesarias para corregir el defecto básico de cada clase de mutación.

Figura nº 11. Clases de mutaciones del gen CFTR.

WT-CFTR	CFTR defect type:					
	I	II	III	IV	V	VI
	No protein	No traffic	No function	Less function	Less protein	Less stable
Mutation examples	G542X (a) W1282X (a) 1717-1G (b)	F508del N1303K A561E	G551D S549R G1349D	R117H R334W A455E	A455E 3272-26A>G 3849+10 kb C>T	c.120del23 rF508del
Corrective therapy	Rescue synthesis	Rescue traffic	Restore channel activity	Restore channel activity	Correct splicing	Promote stability
Drug	Read-through compounds	Correctors	Potentiators	Potentiators	AONs Correctors Potentiators	Stabilizers
Drug approved (Yes/No)	No	No	Yes	No	No	No

CFTR: Regulador de la Conductancia Transmembrana en FQ; WT: wild-type; AON: antisense oligonucleotide. Adaptado de Amaral *et al.* (2015).

6.1.2. Agentes osmóticos y mucolíticos

- Suero salino hipertónico (al 7%).

Inhalado es el más usado y ha demostrado reducir exacerbaciones pero el impacto sobre la función pulmonar es menos clara (Elkins *et al.*, 2006).

- Manitol en polvo seco inhalado.

Fue valorado en un ensayo (Fase III) con un incremento significativo en el FEV1 (durante las primeras 26 semanas) y se mantuvo hasta las 52 (Bilton *et al.*, 2011).

Una revisión reciente de la Cochrane (Elphick *et al.*, 2014) sugiere que el manitol debería ser considerado como un tratamiento para los enfermos de FQ, sin embargo, son necesarios estudios que comparen su eficacia frente a otros mucolíticos establecidos.

- Dornase alfa (Pulmozyme[®]):

Es una desoxirribonucleasa (DNAsa) recombinante humana I, que escinde el ADN extracelular reduciendo la viscosidad y mejorando el aclaramiento mucociliar. Un uso similar tiene la N-acetilcisteína.

6.1.3. Agentes antiinflamatorios

- Ibuprofeno.

Debe usarse en pacientes mayores de 6 años y FEV1 \geq 60% aunque temporalmente ser suprimidos cuando el enfermo está recibiendo también un aminoglucósido intravenoso (Lahiri *et al.*, 2014).

- Azitromicina.

Tiene efectos antiinflamatorios pero el mecanismo de acción no se conoce. Está contraindicada en infecciones por micobacterias no tuberculosas. Ha sido eficaz en niños con o sin infección crónica por *P. aeruginosa*. Un estudio actualmente está revisando su efectividad en el desarrollo de bronquiectasias (COMBAT-CF. ClinicalTrials.gov identifier NCT012 700 74).

- Inhibidores de la fosfodiesterasa-5 (PDE5).

Hay evidencia de atenuación de la inflamación en ratones con FQ (Noel, Dhooghe, & Leal, 2012).

- Sildenafil.

Hay un ensayo en marcha en niños de 12 años con FQ en EE.UU (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00659529) y también están en estudio N-acetilcisteína y ácido docosahexaenoico.

- SB-656933.

Es un antagonista de CXCR2, que parece inhibir el reclutamiento y activación de los neutrófilos en el pulmón, aunque es necesaria una mayor evaluación (Moss *et al.*, 2013).

- Corticoides sistémicos a días alternos e inhalados.

Su administración a largo plazo, puede provocar los efectos secundarios ampliamente conocidos como la intolerancia a la glucosa y retraso del crecimiento.

6.1.4. Agentes antiinfecciosos

- Tobramicina.

Usada durante años como una solución de tobramicina inhalada, ahora puede ser liberada más rápidamente mediante forma medicamentosa de polvo seco para inhalar (Geller *et al.*, 2014). Puede utilizarse en niños de 6 años y mayores aunque con tasas más altas de tos y disfonía.

- Colistina.
Los efectos beneficiosos de la inhalada en la función pulmonar, calidad de vida y presencia de bacterias en el esputo, ha sido demostrado (Valerius, Koch, & Høiby, 1991). A largo plazo parece promover la selección de los patógenos, favoreciendo la colonización por *P. aeruginosa*. Una nueva formulación de polvo seco se ha desarrollado para niños de 6 años.
- Aztreonam en solución inhalada.
Dio mejores resultados en un estudio comparativo frente a tobramicina en solución nebulizada (en niños de 6 años y con un FEV1 < 75%), en términos de incremento de función pulmonar y disminución de tasas de exacerbación (Assael *et al.*, 2013).
- Amikacina liposomal nebulizada.
Tiene una vida media prolongada en las vías aéreas y se activa en los lugares en los que asienta la infección. En un estudio se observó incremento en el FEV1 y mejoría de la calidad de vida así como un descenso en la densidad de *P. aeruginosa* en el esputo (Clancy *et al.*, 2013).
- Combinación de fosfomicina/tobramicina inhalada.
Actualmente está en estudio (Trapnell *et al.*, 2012).
- Anticuerpo aviar contra *P. aeruginosa* (PsAer-IgY) (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01455675).
Aún bajo investigaciones iniciales.

Generalmente las infecciones en pacientes con FQ son tratadas con ciclos de antibióticos de 10 a 21 días. En la Tabla nº 15 se pueden observar las recomendaciones para la terapia antibiótica en la prevención, control o erradicación de la infección pulmonar en FQ en EE.UU, Canadá y Europa.

Tabla nº 15. Recomendaciones sobre el tratamiento antimicrobiano dirigido.

Prophylaxis of infection ^{12,13}	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Oral flucloxacillin is prescribed in young children in the UK This prophylactic treatment is not advocated by a US consensus report because of the scarcity of evidence
Eradication of initial infection ^{7,10,12,13}	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aerosolised antibiotics have been recommended for eradication of initial infection in the UK, USA, and Europe with inhaled tobramycin advised in a European consensus report First-line treatment in the UK is nebulised colistin and oral ciprofloxacin When a more aggressive treatment is needed intravenous antibiotics are used including meropenem and tobramycin
<i>S aureus</i>	Eradication with oral antibiotics including flucloxacillin, sodium fusidate, or rifampicin is recommended in the UK and Europe Combination oral or intravenous antibiotic treatment might be necessary for refractory infections
<i>Haemophilus influenzae</i>	UK and European guidelines advocate an oral antibiotic including co-amoxiclav or doxycycline
Suppression of chronic infection ^{7,10,12,13}	
<i>P aeruginosa</i>	First-line treatment in the UK is nebulised colistin A US consensus report ¹² recommends nebulised tobramycin, which is also second-line treatment in the UK Inhaled aminoglycosides or colistin is advised in a European consensus report ¹⁰ In 2010, nebulised aztreonam was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and is an option for patients with cystic fibrosis
Treatment of pulmonary exacerbations ^{11,13}	
Depends on the bacterium isolated	Two or more antibiotics with different mechanisms of action are normally used and are administered intravenously, orally, or via inhalation

Tomado de Sherrard *et al.* (2014).

Un estudio randomizado realizado en 2011, encontró que no existen diferencias entre hacer el seguimiento del paciente (una vez tratada la infección) mediante LBA comparado con la utilización de dos cultivos orofaríngeos en niños pequeños con FQ (Wainwright *et al.*, 2011).

La terapia de supresión crónica con antibióticos inhalados como tobramicina y aztreonam parece disminuir la frecuencia de exacerbaciones pulmonares aunque no se conoce su impacto en la mortalidad.

En la ABPA, la principal terapéutica consiste en administrar altas dosis de corticoesteroides y aunque los beneficios a largo plazo no están claros, los efectos adversos si están bien documentados. Según dos revisiones recientes de la Cochrane, en ABPA los antifúngicos azoles (principalmente itraconazol) pueden tener algunos beneficios en normalizar los parámetros inmunológicos y la función pulmonar, tras 16 semanas de tratamiento en individuos con asma. Sin embargo en

FQ no hay suficiente evidencia que soporte la utilidad de esa terapia (Moreira et al., 2014), al no haber ensayos que evalúen su uso para ABPA en personas con FQ.

En un trabajo realizado en Alemania (Fischer *et al.*, 2014) que estudió las mutaciones del gen *cyp51A* y la resistencia a los azoles, se sostiene que ésta puede existir en pacientes que no han sido tratados previamente y sugiere por tanto, que habría que ver la sensibilidad en los enfermos que requieran tratamiento.

Es bien sabido que el uso de antibióticos a largo plazo, provoca un descenso en la diversidad bacteriana y permite el aumento de *P. aeruginosa* (Klepac-Ceraj *et al.*, 2010), sin embargo poco se sabe del impacto de los azoles en la biota fúngica en FQ.

El uso de antibióticos ha contribuido a aumentar la esperanza de vida de los pacientes con FQ, y aunque la resistencia antimicrobiana emergente y por tanto la selección de bacterias resistentes es un asunto de importancia, su relevancia clínica en FQ aún no se ha definido, lo que es esperable en enfermos que viven más años y se exponen a un mayor número y combinación de antibióticos.

Son factores que contribuyen a la selección de bacterias multirresistentes el desarrollo de genes de resistencia y la transferencia genética horizontal entre gérmenes, la conversión mucoide y la formación de biofilm (Kamath *et al.*, 2015) además de la exposición de estos microorganismos a concentraciones subinhibitorias, todo ello favorecido por el pH ácido y la hipoxia existente en las vías aéreas.

Por ello son necesarias estrategias dirigidas a combatir el crecimiento en biofilm, a prevenir la aparición de mutaciones de resistencia, a promover el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos contra los resistentes y a implementar las medidas para el control estricto de la infección (López-Causapé et al., 2015).

6.1.5. Terapia génica

Hoy día hay muchas estrategias diferentes para la transferencia genética pero no existen datos sobre la eficacia clínica de esta terapia. Se han investigado dos métodos de transferencia (vectores virales y no virales). En cuanto a los primeros, se han utilizado adenovirus y lentivirus, de los que actualmente se está

desarrollando una forma modificada (Davies, Ebdon, & Orchard, 2014), (Griesenbach *et al.*, 2012), su uso está limitado porque dan lugar a respuestas inmunes. Respecto a los segundos, se ha utilizado un lípido catiónico (GL67) pero se ha visto que puede provocar una respuesta del sistema inmune innato. Actualmente el vector catiónico lipídico (GL67A) está en estudio (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01621867).

A pesar de los tratamientos disponibles (Pittman & Ferkol, 2015), alrededor del 90% de los pacientes morirán de fallo respiratorio a menos que reciban un trasplante pulmonar (Davies *et al.*, 2014).

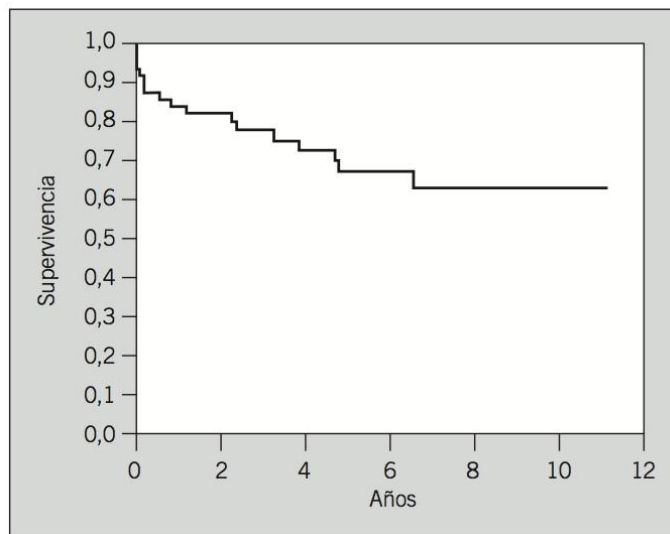
6.2. Tratamiento quirúrgico (Trasplante pulmonar)

A pesar de las diversas pautas de tratamiento instauradas para el control de la inflamación y de las infecciones respiratorias, en ocasiones, el trasplante pulmonar representa la única y agresiva opción terapéutica para los que sufren daño pulmonar grave. Esta terapia no es curativa pero ha supuesto un avance notable en el aumento de la supervivencia de los pacientes con FQ en estadio avanzado de la enfermedad y su pronóstico está determinado, por el rechazo del injerto y las infecciones oportunistas.

De acuerdo con la ISHLT la FQ es la tercera causa de trasplante pulmonar (16.8%). El funcionamiento del injerto y la pervivencia del paciente después de la intervención quirúrgica, son mejores que en la mayoría de otras indicaciones. Se calculó una mediana de ésta de 7,5 y de 10,4 años en pacientes que habían sobrevivido el primer año (Christie *et al.*, 2012).

Solé *et al.* (2006) publicó en 2006 la curva de supervivencia de los pacientes con FQ trasplantados de pulmón (Figura nº 12).

Figura nº 12. Curva de supervivencia de los pacientes con fibrosis quística trasplantados de pulmón.



Tomado de Sole *et al.* (2006).

Los pacientes con FQ generalmente requieren un trasplante pulmonar bilateral, cuyas indicaciones más importantes son enfisema (27%), FQ (26%) y fibrosis pulmonar idiopática (17%). La técnica más extendida hoy día es secuencial. El abordaje más común es la toracotomía anterolateral bilateral (Boasquevisque *et al.*, 2009). Sin embargo, el injerto lobar es una opción viable que tiene supervivencia excelente y función comparable a los receptores del órgano completo, aunque comporta el riesgo de una mayor incidencia de disfunción primaria del injerto. Esto es sobre todo importante, para los pacientes de menor tamaño, que tienen que esperar más tiempo hasta poder recibir un pulmón compatible (Stanzi *et al.*, 2014).

En España, entre 1996 y 2013, se sometieron 114 niños a trasplante pulmonar, lo que ha supuesto el 3,9% de todos los operados, siendo la FQ la causa más común (70-80% de todos los que se llevan a cabo en adolescentes). En la mayoría de los casos se realiza bilateral, y generalmente con la ayuda de circulación extracorpórea. Existen complicaciones específicas en los niños como el síndrome linfoproliferativo postrasplante o una mayor gravedad de las infecciones por virus respiratorios. El 88% de los pacientes no tienen limitaciones en su actividad a los 3 años de la intervención. Según el registro de la ISHLT, la supervivencia a los cinco es del 54% y a los diez del 35% (Moreno Galdó, Solé Montserrat, & Roman Broto, 2013).

La inclusión en lista de espera es necesaria cuando el trasplante pulmonar sea la solución óptima para prolongar y mejorar la calidad de vida. Por ello debido a los factores que se asocian a un incremento de la mortalidad, se recomienda derivar para estudio pretrasplante según (Orens *et al.*, 2006) los siguientes factores:

- FEV1 \leq 30% del predicho.
- Rápido empeoramiento clínico, particularmente en mujeres y jóvenes.
- Necesidad de oxigenoterapia por hipoxemia.
- Hipercapnia.
- Exacerbación frecuente con escasa respuesta a antibioterapia intravenosa.

Teniendo en cuenta que los factores que aumentan el riesgo de muerte durante la permanencia en lista de espera para trasplante son (Orens *et al.*, 2006); fallo respiratorio dependiente de oxígeno, hipercapnia crónica, hipertensión pulmonar y desnutrición (principalmente en mujeres).

En un estudio (Mayer-Hamblett *et al.*, 2002) basado en el registro de la Fundación Nacional de Pacientes con FQ en 1996 en EE.UU con 14.572 enfermos mayores de 6 años, se observó que la edad, la altura, FEV1, microbiología respiratoria, número de hospitalizaciones por exacerbaciones pulmonares y número de ciclos de antibioterapia intravenosa domiciliaria, son predictores significativos de mortalidad a los dos años.

Las guías de práctica clínica internacionales establecen un umbral de FEV1 del 30% del previsto, para la inclusión de los pacientes con FQ en lista de espera para trasplante. Sin embargo, el trabajo realizado en EE.UU con 277 enfermos (Hayes *et al.*, 2015) recomienda el uso de un umbral de FEV1 menor (\leq 25%) y tener en cuenta la capacidad vital forzada (FVC) (\leq 40%) cuando se incluyan a los pacientes en lista de espera a fin de optimizar la supervivencia a largo plazo.

Smyth *et al.* (2014) han establecido los criterios de exclusión para el trasplante pulmonar que se relacionan: Neoplasia en los dos años previos, aunque la mayoría de centros fijan un periodo libre de enfermedad de 5 años, pudiendo haber consideraciones especiales para algunas de ellas (dermatológicas o urogenitales). Disfunción de otro órgano mayor (corazón, hígado, riñón) no candidato a trasplante combinado. Infección crónica extrapulmonar por VIH (aunque se han

hecho éstos con éxito en pacientes VIH (Bertani *et al.*, 2009), VHB y VHC. Deformidad esquelética severa de la caja torácica o columna vertebral. Osteoporosis importante o sintomática. Pobre adherencia al tratamiento, alteraciones psicológicas que lo impidan o incumplimiento del seguimiento. Ausencia de soporte sociofamiliar y adicción al consumo de sustancias (alcohol, tabaco) en los seis meses previos.

Algunos centros trasplantadores consideran como contraindicaciones relativas según Hirche *et al.* las siguientes: Edad superior a 65 años. Situación clínica inestable o crítica, o muy limitada con poca posibilidad de rehabilitación. Colonización por *B. cenocepacia*, *B. gladioli* y *M. abscessus*. Enfermedades con un tratamiento subóptimo (hipertensión arterial, diabetes mellitus, diabetes relacionada con la fibrosis quística, osteoporosis o enfermedad arterial coronaria)(Hirche *et al.*, 2014).

Con respecto a otras infecciones (*P. aeruginosa* multirresistente, *Scedosporium sp.* y *C. difficile*) dependen de la política y experiencia de cada unidad. Por ejemplo, en la del Hospital 12 de Octubre de Madrid, la colonización fúngica pulmonar y por *M. tuberculosis*, son contraindicaciones relativas, y la infección VIH o por VHC son absolutas (de Pablo *et al.*, 2013) para la intervención.

Según una revisión de la literatura publicada en 2011, los efectos beneficiosos del trasplante pulmonar no difieren entre pacientes infectados y no infectados por *CBC*, pues no hubo diferencias en supervivencia ni en mayor riesgo de mortalidad. Sin embargo, como ya se apuntaba en el apartado de infecciones, no ocurre lo mismo en los pacientes afectados por *B. cenocepacia* previamente al trasplante pues tienen una menor supervivencia a corto y largo plazo (Olland *et al.*, 2012). Se ha descrito una pervivencia del 3% al año en enfermos que estaban infectados por *CBC* antes del implante, comparado con la existente al año del 70%, en pacientes con *P. aeruginosa* (Chaparro *et al.*, 2001).

Un estado nutricional pobre, es un factor de riesgo independiente para la menor supervivencia en FQ y así mismo, el problema del aclaramiento mucociliar, no se elimina con el trasplante, ya que las membranas mucosas de los senos paranasales también muestran el defecto del gen CFTR.

Los receptores de pulmones, habitualmente reciben triple terapia inmunosupresora, combinando un inhibidor de la calcineurina (tacrólimus o ciclosporina A), un agente antiproliferativo (micofenolato de mofetil, micofenolato sódico o azatiprina) y glucocorticoides (Tabla nº 16). El uso de profilaxis antifúngica (voriconazol y posaconazol) puede interactuar con los inhibidores de la calcineurina, pudiendo afectar por tanto a los niveles plasmáticos de éstos inmunosupresores.

Tabla nº 16. Inmunosupresión en el primer año postrasplante.

Therapy	Dosing
Prednisone/prednisolone	5 mg daily
Mycophenolate mofetil	500–1500 mg twice daily
or mycophenolic acid	360–720 mg twice daily
Cyclosporin A	Targeting blood level of 150–200 ng/mL
or tacrolimus	Targeting blood level 8–10 ng/mL

Tomado de Hirche *et al.* (2014).

El estudio realizado en Austria con 146 pacientes entre enero de 1999 y diciembre de 2010, se investigó el impacto de la terapia de inducción con globulina antitimocítica en pacientes con FQ tras el trasplante pulmonar, demostrando que la supervivencia perioperatoria fue significativamente mejor en el grupo que recibió dicha terapia, debido a una menor incidencia de rechazo agudo sin incremento en las complicaciones infecciosas (Jaksch *et al.*, 2013).

La profilaxis de las infecciones en estos enfermos es un tema controvertido. En cuanto a la vírica, ante CMV, se desconoce su duración óptima en los pediátricos trasplantados. Aunque el estudio (Spivey *et al.*, 2007) basado en cultivos celulares realizado en EE.UU en receptores de pulmón entre 6 y 18 años por FQ y otras causas, se observó que el uso de la administración prolongada con ganciclovir durante 12 semanas es factible, seguro y efectivo para prevenir la viremia por CMV basado en cultivos virales. En 2011 (Finlen Copeland *et al.*, 2011) con 38 pacientes trasplantados de pulmón (entre ellos con FQ) en Carolina del Norte, concluyen que la profilaxis prolongada (12 meses) con valganciclovir, proporciona un beneficio protector a largo plazo comparado con la terapia a corto (3 meses) sin incremento de los efectos adversos hematológicos. También Lefeuvre *et al.* (2010) compararon

la aplicación de ganciclovir oral con valganciclovir intravenoso, afirmando que a dosis de 900 mg y ajustado a la función renal, era efectivo y seguro para una profilaxis larga. Así mismo los resultados de Suhling *et al.* (2013) sugieren que la profilaxis con colistina inhalada en afectados de FQ, mejora el mantenimiento de la esterilidad de las vías aéreas, lo que supone una serie de efectos beneficiosos con impacto en la supervivencia a largo plazo.

En lo referente a la profilaxis fúngica, el estudio realizado en Copenhague desde 2002 a 2006 con 139 personas con injertos pulmonares, en los que se establecieron dos grupos en función de recibir o no profilaxis antifúngica con voriconazol (Tofte *et al.*, 2012), no se observó el efecto de voriconazol en la incidencia por *Aspergillus* (colonización, infección superficial o invasiva) o en el tiempo desde el trasplante hasta el primer signo de infección entre ambos grupos. La incidencia acumulada fue del 45% en el grupo sin profilaxis y del 49% en el que se aplicó ésta, y en ambos la mitad de las infecciones ocurrieron en los tres primeros meses postrasplante. Entre los infectados por *Aspergillus*, había más con FQ que en otros grupos de forma significativa y el efecto de la profilaxis fue el mismo en todos. Según esto no es recomendable la profilaxis fúngica con voriconazol para evitar la afección por este hongo en trasplantados pulmonares.

La monitorización de los niveles de voriconazol es necesaria ya que son a menudo indetectables en pacientes con FQ intervenidos que están recibiendo distintos tratamientos (como tacrólimus), apoyando el uso de combinaciones de antifúngicos hasta que la concentración mínima de voriconazol esté entre 1 y 2 mg/L (Berge *et al.*, 2009).

La profilaxis antifúngica es un tema controvertido en este tipo de cirugías, principalmente durante los tres primeros meses, pues hay trabajos que defienden que en las colonizaciones por hongos distintos a *Aspergillus* no es rentable (Silveira *et al.*, 2008). En el hospital universitario La Fe de Valencia (Solé, 2011), cuando se detecta colonización por hongo en esputo u otra muestra respiratoria y existen factores de riesgo (pulmón nativo o bronquiectasias como resultado de rechazo crónico), se prefiere una profilaxis antifúngica dirigida de forma agresiva durante un largo periodo, aunque la detección precoz y el tratamiento de ataque, son la clave para mejorar la supervivencia del paciente.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Los pacientes con FQ constituyen un grupo de riesgo para la colonización por *P. jirovecii* y otras especies fúngicas y bacterianas, debido a diversas causas entre las que destacan el uso de fármacos como los esteroides o al déficit en el aclaramiento mucociliar.

El trasplante de pulmón constituye una alternativa eficaz para los enfermos con FQ, siendo las infecciones una de las principales complicaciones en estos pacientes, destacando entre ellas las neumonías y las fúngicas invasivas.

La colonización por *P. jirovecii*, a pesar de ser frecuente no parece suponer un riesgo para el desarrollo de neumonía (PcP) en los pacientes con FQ, pero esta situación puede variar al ser sometidos a trasplante pulmonar y recibir tratamiento inmunosupresor. En la misma línea, la colonización ocasionada por otros hongos podría también verse favorecida en estas circunstancias y constituir un riesgo para el desarrollo de infecciones invasivas como la causada por *A. fumigatus*.

En la actualidad son escasos los datos sobre la colonización fúngica en pacientes con FQ sometidos a trasplante pulmonar. Conocer la frecuencia y los tipos que se pueden presentar en estos enfermos, podría ayudar a diseñar estrategias preventivas eficaces. Por otra parte, sería deseable disponer de biomarcadores que facilitaran la identificación de estas situaciones de colonización.

HIPÓTESIS DE PARTIDA

HIPÓTESIS DE PARTIDA

Los pacientes con FQ constituyen un grupo de riesgo para la colonización por *P. jirovecii* y otras especies tanto fúngicas como bacterianas, debido entre otras causas al uso de fármacos inmunosupresores como los esteroides o la antibioterapia de amplio espectro, así como al déficit en el aclaramiento mucociliar.

Esta situación de colonización puede suponer un peligro para el desarrollo de neumonía por *P. jirovecii* (PcP) así como de infecciones fúngicas invasivas, una vez que los pacientes con FQ son sometidos a la necesaria inmunosupresión para el trasplante pulmonar.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Describir la población fúngica que coloniza el tracto respiratorio de los pacientes con fibrosis quística sometidos a trasplante pulmonar.
- Conocer la dinámica de la microbiota que coloniza el tracto respiratorio de este grupo de enfermos.
- Identificar las diferencias que puedan existir en las poblaciones fúngicas que colonizan el sistema respiratorio en pacientes con fibrosis quística con y sin pulmón trasplantado.
- Comprobar la utilidad de la determinación de los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano como marcador de colonización fúngica en pacientes con fibrosis quística con y sin trasplante pulmonar.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ámbito del estudio

El proyecto se realizó en la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, de referencia regional. Los estudios de las muestras biológicas se han llevado a cabo en las instalaciones con las que cuenta el grupo de investigación en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

2. Población

Se incluyeron once pacientes con FQ y trasplante de los que tres (27,30%) eran hombres y ocho mujeres, con una edad media de $21,9 \pm 6,9$ (rango: 13-32 años). El tiempo medio de seguimiento desde la intervención fue de $3,4 \pm 1,3$ años (rango: 2-6 años). Todos ellos estaban recibiendo quimioprofilaxis frente a *P. jirovecii* con trimetoprim-sulfametoxazol.

También se incluyeron 13 sujetos como grupo control, siete de ellos con FQ que tenían una edad comprendida entre los 13 y los 32 años ($21,9 \pm 6,9$ años) y dos (28%) eran hombres. Los seis individuos sin enfermedad pulmonar, seleccionados de otros estudios, tenían entre 41 y 75 años (57 ± 14 años) de los que cinco (83%) eran varones.

Tanto los pacientes con FQ trasplantados como los sujetos control, fueron seguidos durante un año con revisiones periódicas cada 6 meses. Los sujetos sin enfermedad pulmonar no tuvieron seguimiento.

2.1. Criterios de inclusión:

- Sujetos trasplantados pulmonares por FQ.
- Disponibilidad para su seguimiento en la consulta especializada.
- Firma del consentimiento informado.

2.2. Criterios de exclusión:

- Rechazo del consentimiento informado.
- Imposibilidad para realizar un lavado orofaríngeo (LOF).
- Cualquier causa que a criterio del investigador no garantizara el seguimiento del paciente.

2.3. Selección de los controles:

Los sujetos controles se eligieron en función de la disponibilidad de la muestra y de la presencia o no de *P. jirovecii*.

2.4. VARIABLES DE ESTUDIO:

- Niveles séricos de betaglucano.
- Presencia de *P. jirovecii*.
- Presencia de otros microorganismos fúngicos.
- Presencia de *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae*.

3. Método

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó una encuesta epidemiológica y una evaluación clínica a fin de recoger información sobre edad, sexo, hábitos tóxicos, situación clínica, tipo de trasplante pulmonar y tiempo transcurrido desde el mismo así como tratamientos recibidos (Anexo I).

4. Técnicas de laboratorio.

4.1. Obtención y almacenamiento de las muestras.

En cada visita de revisión se procedió a la obtención de las muestras de LOF para lo que cada paciente realizó un minuto de gargarismos con 10 ml de suero fisiológico estéril al 0.9% y se depositaron cada uno de ellos en un tubo Falcon de 50 ml (BD Falcon TM) debidamente identificado. Las muestras se almacenaron en una nevera con hielo hasta su recepción en el laboratorio del IBiS para su posterior estudio mediante técnicas moleculares.

Cada muestra se dividió en dos alícuotas que se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet que fue resuspendido en 1 ml de suero fisiológico, para conseguir dos alícuotas de 500 µL por cada muestra. Una de ellas se utilizó para la extracción de ADN y la segunda se conservó como réplica a -20°C.

Además se extrajo a cada enfermo una muestra de sangre periférica, para la determinación de los niveles séricos de betaglucano mediante el test Fungitell®.

4.2. Extracción de ADN.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de cada una de las alícuotas de 500 µL de lavado orofaríngeo, utilizando el kit comercial NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Alemania).

La digestión de las muestras se llevó a cabo con un protocolo específico puesto a punto en nuestro laboratorio que asegura la integridad del ADN; las muestras se digieren a 56^o C en baño termostático, en agitación durante la noche, utilizando como agente quelante EDTA a una concentración de 2mM y pH=8, como detergente SDS a una concentración del 10% y Proteinasa K a una concentración de 14mg/ml.

Una vez digeridas las muestras, el proceso de extracción y purificación del ADN genómico de las células se realizó mediante una cromatografía de adsorción en columnas. Para ello se utilizó un kit comercial (Nucleospin tissue, Macherey & Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante tal y como se especifica en el Anexo II. El ADN extraído se eluyó con 60 µl de agua ultrapura y se conservó a -20°C hasta el momento del análisis.

4.3. Identificación y caracterización molecular de *P. jirovecii*.

4.3.1. Técnicas de amplificación del ADN

La identificación molecular y la posterior determinación de los polimorfismos de *P. jirovecii* se realizó en un *locus* del genoma del microorganismo: el gen que codifica la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial (mtLSUrRNA). El gen multicopia, mtLSUrRNA, se caracteriza por estar ampliamente conservado e interviene en funciones metabólicas básicas del microorganismo.

La detección de la región mtLSUrRNA se realizó mediante PCR tipo anidada. La identificación de los diferentes genotipos del fragmento mtLSUrRNA se realizó según se detalla a continuación, mediante secuenciación directa del producto amplificado de la PCR.

4.3.2. Identificación del gen mt LSU rRNA

La identificación de ADN de *P. jirovecii* se realizó mediante una variante de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (PCR anidada) utilizando el ADN genómico aislado de las muestras de lavado orofaríngeo. Se amplificó un fragmento del gen de la región mitocondrial mt LSU rRNA de *Pneumocystis jirovecii*, utilizando los cebadores externos paZ102E-paZ 102H que amplifican una secuencia de 346 pares de bases. La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de 25 μ l, que incluía: 3 μ l del ADN extraído de cada alícuota, 2.5 μ l de NH₄ reaction Buffer 10x (Bioline), 0,25 μ l de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/ μ l de Bioline), 0,5 μ l de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1 μ M de cada dNTP), 0.5 μ l de cada cebador (concentración de 20 μ M cada uno) y 0,75 μ l de MgCl₂ 50mM

Tras la primera ronda de amplificación se extrae ADN preamplificado de la primera reacción y se realiza un nuevo protocolo de PCR. En esta ocasión, la mezcla de reacción es similar salvo por los cebadores utilizados, que son los cebadores internos paZ 102X- paZ 102Y que amplifican una región de 256 pares de bases del mismo gen. La mezcla de PCR para esta segunda ronda se preparó para un volumen final de 50 μ l, que incluían: 5 μ l de ADN, 5 μ l de NH₄ reaction Buffer 10x (Bioline), 0,5 μ l de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/ μ l de Bioline), 1 μ l de una mezcla de nucleótidos trifosfato (1 μ M de cada dNTP), 1,2 μ l de cada cebador a una concentración de 20 μ M cada uno y 1,5 μ l de MgCl₂ 50mM.

La amplificación de ADN mediante PCR se realiza en el termociclador suministrado por Biometra (Hilden, Alemania) siguiendo para ambas rondas el programa PC 40 que consiste en un primer ciclo de desnaturalización de 94^oC durante 5 min. Seguido de 35 ciclos de amplificación que comprende tres fases: desnaturalización 92^oC durante 30 segundos, unión del cebador 55^oC durante 30 segundos y extensión de la polimerasa durante 2 minutos. Finalmente, tras los 35 ciclos de amplificación se programa un segmento de extensión a 72^oC durante 2 minutos.

Las Tablas n^o 17 y n^o 18 muestran las condiciones de la PCR nested, los cebadores utilizados y el tamaño del fragmento amplificado para cada una de las rondas.

Tabla nº 17. Condiciones de la primera ronda de amplificación utilizada para detectar la presencia del locus mt LSU.

1ª Ronda de PCR nested				Características
Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Cebadores:
Activación	1	94°C	5 min.	pAZ102-E
Desnaturalización	35	92°C	30 seg.	5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3'
Alineamiento		55°C	30 seg.	pAZ102-H:
Elongación		72°C	2 min.	5'-TCACTTAATATTAATTGGGGAGC-3'
Elongación final	1	72°C	5 min.	Tamaño del amplificado: 356pb

°C, grados centígrados; min., minutos; seg., segundos; pb., pares de bases.

Tabla nº 18. Condiciones de la segunda ronda de amplificación utilizada para detectar la presencia del locus mt LSU.

2ª Ronda de PCR nested				Características
Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Cebadores:
Activación	1	94°C	5 min.	pAZ102-X:
Desnaturalización	40	92°C	30 seg.	5'-GTGAAATACAAATCGGACTAGG-3'
Alineamiento		55°C	30 seg.	pAZ102-Y:
Elongación		72°C	2 min.	5'-TCACTTAATATTAATTGGGGAGC-3'
Elongación final	1	72°C	5 min.	Tamaño del amplificado: 260pb

°C, grados centígrados; min., minutos; seg., segundos; pb., pares de bases.

Los productos de amplificación de ambas PCR, se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que contenía bromuro de etidio y las bandas se visualizan mediante luz ultravioleta. La identificación de una banda de 256 pares de bases indica la presencia de ADN de *P. jirovecii* en la muestra analizada.

Para evitar falsos positivos debido a una posible contaminación, en todas las etapas de manipulación de las muestras se utilizaron puntas de pipeta con filtro. La preparación de la mezcla de reacción, la amplificación por PCR y la detección se realizaron en diferentes recintos del laboratorio. Para detectar una posible contaminación cruzada, todas las reacciones de PCR llevaban como control negativo H₂O estéril.

4.3.3. Identificación de los polimorfismos del gen mt LSU rRNA

La identificación de los polimorfismos del gen mt LSU rRNA se realizó a partir del fragmento previamente amplificado en las muestras positivas. Para obtener ADN susceptible de ser secuenciado es necesario primero realizar una purificación de los productos de PCR mediante cromatografía de exclusión molecular

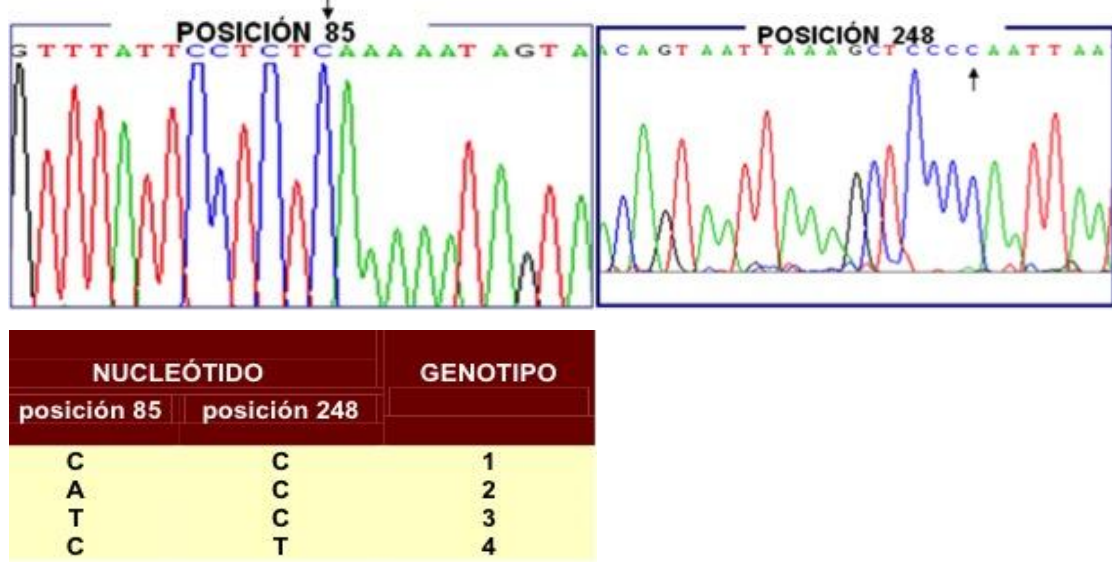
La purificación de los amplicones; la reacción de secuenciación y posterior de la precipitación de la muestra se realizan siguiendo el protocolo que se detalla en el Anexo III.

Por último, en un secuenciador *ABI Prism 310 genetic analyzer* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) se realiza la secuenciación mediante electroforesis capilar de los fragmentos de ADN de diferentes tamaños sintetizados durante la reacción de secuenciación. Según la técnica las elongaciones quedaron interrumpidas al incorporar un dideoxinucleótido trifosfato marcado con un fluorocromo que permite su identificación selectiva.

Hasta la fecha en esta región del genoma se han descrito 6 subtipos en función de los diferentes polimorfismos identificados en las posiciones 85 y 248 del gen (Figura nº 13).

Para el análisis de las secuencias obtenidas se utiliza, en nuestro caso, el software de Macintosh Sequence Navigator de PE-Applied Biosystem. En la Figura nº 29 se muestran dos ejemplos de los resultados de la secuenciación obtenidos para los polimorfismos 85 y 248.

Figura nº 13. Secuenciación del locus mtLSU rRNA de *Pneumocystis jirovecii*.



4.4. Determinación de la presencia de otros hongos.

El análisis de la presencia de otros hongos se realizó mediante la amplificación del gen específico de hongos ITS (del inglés Internal Transcribed Spacers) mediante PCR anidada y posterior secuenciación directa para las poblaciones aisladas o clonación en caso de la obtención de más de un hongo.

Para la amplificación del gen ITS, se realizaron dos rondas consecutivas de PCR, empleando para ello diferentes cebadores en cada parte. En la primera ronda de amplificación se utilizaron los cebadores ITS-1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Estos cebadores flanquean una región entre 500 y 800 pb. del genoma de diferentes hongos. Posteriormente se realizó una segunda ronda de amplificación con la utilización de los cebadores ITS-1 e ITS-3 (5'- GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') que amplifican una región de 200 – 500 pb.

En la preparación de la primera mezcla de reacción se utilizaron 132 µl. de H₂O, 20 µl. de reacción Buffer 10x (Bioline), 10 µl. de MgCl₂, 4 µl. de cada cebador (concentración de 20 µM), 4 µl. de nucleótidos trifosfato y 1,6 µl. de Taq (Bio Taq ADN pol. 5U/mcl. de Bioline), siendo añadidos en este orden consecutivo. El volumen final fue de 25 µl. (3 µl. de ADN total) para la primera ronda. La segunda mezcla se preparó con 213 µl. de H₂O, 32 µl. de reacción Buffer, 16 µl. de MgCl₂, 8

μl. de cada cebador, 8 μl. de dNTP, y 2,4 μl. de Taq (Bio Taq ADN pol. 5U/mcl. de Bioline), con un volumen final de 40 μl. (4 μl. de la primera PCR) para la segunda ronda, respetándose dicho orden.

Ambas amplificaciones se llevaron a cabo en el T3000 Thermocycler (Biometra), siguiendo programas distintos para la primera y la segunda ronda.

Los productos de PCR obtenidos se incluyeron en gel de agarosa al 2%, que contenía bromuro de etidio, visualizándose las bandas con el transiluminador. Posteriormente, los fragmentos amplificados obtenidos se prepararon para la secuenciación. En función de las características de los fragmentos obtenidos se realizaron algunos pasos intermedios con el fin de obtener una muestra con la mejor calidad posible:

Clonación: en caso de identificación de varios fragmentos que no se separaban entre sí por su similar tamaño durante la electroforesis.

Si los fragmentos tenían diferentes pesos moleculares, se separaban en un gel de agarosa. Las bandas obtenidas se cortaron con un bisturí y se purificaron.

Cuando en las muestras sólo se amplificó un fragmento se realizó la purificación, considerándose que dicho fragmento contiene una única especie fúngica.

4.5. Determinación de la presencia de colonización bacteriana.

Se estudiaron dos especies bacterianas: *P. aeruginosa* por su papel patogénico establecido en FQ y *S. pneumoniae* por su frecuencia, mediante técnicas moleculares de PCR simple que se detallan a continuación.

4.5.1. Identificación de *P. aeruginosa*.

La detección de ADN de *P. aeruginosa* se realizó siguiendo un protocolo de amplificación utilizando los cebadores consenso PA01A y PA01S que amplifican un fragmento de 136 pb. La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de 25 μl., que incluía: 2 μl. del ADN extraído de cada alícuota, 2,5 μl. de NH₄ reaction Buffer 10x (Bioline), 0,25 μl. de Taq (Bio Taq DNA pol. 5U/ μl de Bioline), 0,5 μl. de una

mezcla de nucleótidos trifosfato ($1\mu\text{M}$ de cada dNTP), $0,5\ \mu\text{l}$. de cada cebador (concentración de $20\ \mu\text{M}$ cada uno) y $0,75\ \mu\text{l}$ de MgCl_2 $50\ \text{mM}$.

4.5.2. Identificación de *S. pneumoniae*.

La detección de ADN de *S. pneumoniae* se realizó siguiendo un protocolo de amplificación utilizando los cebadores consenso LyTAF y LyTAR. La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de $20\ \mu\text{l}$., que incluía: $2\ \mu\text{l}$. del ADN extraído de cada alícuota, $2\ \mu\text{l}$. de NH_4 reaction Buffer $10\times$ (Bioline), $0,2\ \mu\text{l}$. de Taq (Bio Taq DNA pol. $5\text{U}/\mu\text{l}$ de Bioline), $0,5\ \mu\text{l}$. de una mezcla de nucleótidos trifosfato ($1\mu\text{M}$ de cada dNTP), $0,4\ \mu\text{l}$. de cada cebador (concentración de $20\ \mu\text{M}$ cada uno) y $0,6\ \mu\text{l}$ de MgCl_2 $50\ \text{mM}$.

4.6. **Determinación de los niveles séricos de (1→3)- β -D-glucano.**

Los niveles séricos de (1→3)- β -D-glucano se determinaron mediante el test Fungitell®, que se basa en una modificación de la ruta del lisado de amebocitos de *Limulus* (extracto acuoso de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*) que se utiliza con frecuencia para detectar endotoxinas bacterianas.

Los (1→3)- β -D-glucanos activan el Factor G, un zimógeno de serín proteasa. El factor G activado convierte la enzima procoagulante inactiva en la enzima coagulante activa que divide el ApN del sustrato péptido cromogénico (Boc-Leu-Gli-ARG-ApN) creando un cromóforo que absorbe a $405\ \text{nm}$. El test se basa en la determinación de la tasa de aumento de la densidad óptica aportada por una muestra, que se interpreta en relación con una curva estándar para producir cálculos aproximados de la concentración de (1→3)- β -D-glucano en la muestra.

El test Fungitell® está aprobado para el diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas. Sus resultados se expresan en pg/ml de suero con un rango entre $>31\ \text{pg/ml}$ y $<500\ \text{pg/ml}$.

Este test no detecta ciertos taxones fúngicos como *Cryptococcus* que tiene niveles muy bajos de (1→3)- β -D-glucano, ni *Zygomycetes* (*Absidia*, *Mucor* y *Rhizopus*) pues no se tiene constancia de que tengan (1→3)- β -D-glucanos.

Los valores de (1→3)-β-D-glucano <60 pg/ml se interpretan como negativos y como positivos ≥80 pg/ml. Un resultado positivo no define la presencia de una enfermedad y por ello se debe utilizar junto con otros criterios clínicos para establecer un diagnóstico. Los valores entre 60 y 79 pg/ml indican una posible infección fúngica por lo que se recomiendan pruebas adicionales.

Valores de (1→3)-β-D-glucano de 80 pg/ml o superior, junto con signos y síntomas, tiene un valor predictivo positivo para infección fúngica invasiva como es la Neumonía por *Pneumocystis* (PCP) del 74,4% al 91,7%, y niveles inferiores a 60 pg/ml en ausencia de sintomatología tiene un valor predictivo negativo entre 65,1% y 85,1%.

Se ha descrito que las dos especies bacterianas analizadas (*P. aeruginosa* y *S. pneumoniae*) elevan los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano (Mennink-Kersten, Ruegebrink, & Verweij, 2008).

5. Controles de calidad.

Para evitar falsos positivos debido a contaminaciones, en todas las etapas se utilizaron puntas de pipeta con filtro. La extracción de ADN, preparación de la mezcla de reacción, amplificación por PCR y detección se efectuaron en distintas áreas. Para detectar la posible contaminación cruzada, todas las reacciones de PCR llevaban como control negativo H₂O estéril.

6. Definición de colonización.

Para los fines de este estudio se ha considerado que un paciente presenta una colonización fúngica cuando en el LOF se identifica la presencia de ADN de algún microorganismo mediante alguna de las técnicas moleculares consideradas y se pueda identificar mediante secuenciación en ausencia de síntomas o signos de neumonía o infección invasiva.

7. Análisis de datos.

Los datos epidemiológicos, clínico-biológicos y moleculares se recogieron mediante un formulario estructurado en donde se incluyeron todas las variables del estudio. Se diseñó un soporte informático específico en ACCESS para el archivo

de datos en cumplimiento de las normas de confidencialidad y privacidad exigidas por la normativa vigente (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 24.0.

Los datos cuantitativos con una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov), se han expresado con su media y su desviación estándar y los cualitativos mediante una distribución de frecuencias.

Se ha realizado una estimación de la prevalencia de colonización por *P.jirovecii* y otros hongos de forma global en el grupo de casos y controles, así como para cada grupo de los sujetos no trasplantados.

Para determinar la asociación entre la presencia de colonización y los niveles séricos de (1→3)- β -D-glucano se ha llevado a cabo una prueba de T de Student o análisis de la varianza (ANOVA) según el caso.

8. Aspectos éticos.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han aplicado los principios éticos recogidos en la última revisión de la declaración de Helsinki. Los datos obtenidos en el estudio han sido utilizados exclusivamente para obtener conclusiones científicas. La identidad de los pacientes es confidencial y sólo es conocida por el clínico responsable de cada paciente. El manejo de los enfermos donde se ha identificado la presencia de colonización por *P. jirovecii* u otro microorganismo, se ha dejado a criterio de su médico responsable según la “*lex artis ad hoc*”. En todos los casos se ha solicitado el consentimiento informado del paciente para participar en el estudio.

Esta tesis se enmarca dentro de dos proyectos de investigación financiados por agencias públicas que cuentan con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla: FIS “Evaluación mediante técnicas metagenómicas de la microbiota del tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística” (PS09/00957) y ERA-Net PathoGenoMics: “*Pneumocystis* PathoGenoMics: Unravelling the colonization to disease shit” (GEN2006-27760-E/PAT).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS ENCONTRADOS.

Las muestras de LOF procedentes de los 11 pacientes trasplantados pulmonares por FQ y de los 13 sujetos controles (7 de ellos con FQ no trasplantados y 6 sin enfermedad pulmonar) fueron analizadas mediante herramientas de biología molecular.

La identificación de *P. jirovecii* se llevó a cabo mediante PCR anidada de la región mt LSU rRNA. La determinación de la presencia de otros hongos se realizó mediante amplificación del gen específico de hongos ITS mediante PCR semi-Nested. El análisis de las secuencias mediante alineamiento BLAST y posterior comparación con las secuencias descritas en la base de datos de PUBMED permitió la identificación de los géneros y especies fúngicas presentes en cada muestra. Además, se identificó la presencia de *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae*.

En la Tabla nº 19 se recoge el encuadre taxonómico de todas las especies fúngicas encontradas en el total de las muestras estudiadas en nuestro trabajo. Hemos identificado 19 géneros fúngicos (*Saccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Geotricum*, *Cladosporium*, *Davidiella*, *Alternaria*, *Cochiobolus*, *Bipolaris*, *Lewia*, *Penicilium*, *Aspergillus*, *Pneumocystis*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Leucosporidiella*, *Cryptococcus* y *Rhodosporium*) y 15 especies fúngicas distintas. El hongo más frecuentemente encontrado ha sido *P. jirovecii* en 33 muestras, seguido muy de cerca por *Candida* en 31 de ellas. Dentro de este género, la especie *C. albicans* ha sido la más frecuentemente encontrada (en 20 muestras) seguida de *C. deformans* (en 4 muestras). También hemos identificado *C. apícola*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. zeylanoides* y *C. parapsilosis*. El género más frecuentemente encontrado en tercer lugar ha sido *Cladosporium*.

En cuanto a la presencia bacteriana, se identificó *P. aeruginosa* en 17 del total de las muestras estudiadas y *S. pneumoniae* en 16 (Tabla nº 19).

Tabla nº 19. Relación de la microbiota encontrada.

REINO	PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE	
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Sacharomycetales (1)	Sacharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i> (2)	
					<i>Candida</i> (1)	<i>albicans</i> (20)	
						<i>apicola</i> (1)	
						<i>deformans</i> (4)	
						<i>glabrata</i> (1)	
						<i>lusitaniae</i> (2)	
						<i>zeylanoides</i> (1)	
						<i>parapsilosis</i> (1)	
					<i>Debaryomyces</i> (2)	sp.	
					<i>Kluyveromyces</i> (1)	sp.	
					Dipodascaceae	<i>Geotricum</i> (1)	<i>fragans</i> (1)
					Dothideomycetes	Capnodiales (1)	Davidiellaceae
	<i>Davidiella</i> (1)	sp.					
	Pleosporales	Pleosporaceae (1)	<i>Alternaria</i> (1)	sp.			
			<i>Cochiobolus</i> (1)	sp.			
<i>Bipolaris</i>	<i>oryzae</i> (1)						
<i>Lewia</i> (2)	sp.						
Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomoaceae	<i>Penicilium</i> (1)	sp.			
			<i>Aspergillus</i> (1)	<i>nidulans</i> (2)			
Pneumocystidomycetes	Pneumocystidales	Pneumocyatidaceae	<i>Pneumocystis</i>	<i>jirovecii</i> (33)			
Basidiomycota (1)	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Incierta	<i>Sporobolomyces</i> (3)	sp.		
			Incierta	<i>Rhodotorula</i> (1)	sp.		
		Leucosporidiales	Leucosporidiaceae	<i>Leucosporidiella</i> (1)	sp.		
	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	<i>Cryptococcus</i> (1)	<i>flavicens</i> (1)		
				<i>estepposus</i> (1)			
Ustilaginomycetes	Utilagiales	Utilaginaceae	<i>Rhodosporum</i> (1)	sp.			
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomona</i>	<i>aeruginosa</i> (17)	
	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillaceas	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i> (16)	

(n) = número de muestras en las que se aísla cada género o especie bacteriana o fúngica.

2. CONTROLES SIN FIBROSIS QUÍSTICA

Como ya detallamos en el apartado de material y métodos se incluyeron seis sujetos sanos procedentes de otros estudios.

2.1. Colonización fúngica en sujetos sin fibrosis quística.

Al inicio del estudio, se detectaron hongos en el 100% de los sujetos en los que se analizaron muestras. Fueron encuadrados en los géneros *Cladosporium* (25%), *Saccharomyces* (50%), *Debaryomyces* (25%), *Candida* (50%), *Lewia* (25%) y *Basidiomycete* (25%), cuya distribución por caso se recoge en la Tabla nº 20. No conociéndose la colonización presentada con posterioridad (6 y 12 meses).

Tabla nº 20. Colonización fúngica en sujetos sin fibrosis quística al inicio del estudio.

Controles	Población fúngica
NO-FQ-1	ND
NO-FQ-2	ND
NO-FQ-3	<i>Cladosporium, Saccharomyces cerevisiae</i>
NO-FQ-4	<i>Debaryomyces no cultivable, Candida sp.</i>
NO-FQ-5	<i>Candida lusitaniae, Lewia no cultivable</i>
NO-FQ-6	<i>Basidiomycete no cultivable, S. cerevisiae</i>

NO-FQ: sujeto sin fibrosis quística; ND: no determinado.

2.2. Niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística con colonización fúngica.

Los niveles séricos de betaglucano en todos los casos fueron inferiores a 60 pg/ml (Tabla nº 21) por tanto ninguno de ellos alcanzó el dintel diagnóstico (≥ 80 pg/ml) con una media de $11,7 \pm 6,9$ (siendo la cifra más alta detectada de 25,6 pg/ml en el paciente con *Debaryomyces sp.*, y estadísticamente significativo $p= 0,004$).

Tabla nº 21. Colonización fúngica y niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística al inicio del estudio.

Controles	Población fúngica	Niveles de betaglucano
NO-FQ-1	ND	11,1 pg/ml
NO-FQ-2	ND	8,3 pg/ml
NO-FQ-3	<i>Cladosporium, Saccharomyces cerevisiae</i>	7,8 pg/ml
NO-FQ-4	<i>Debaryomyces no cultivable, Candida sp.</i>	25,6 pg/ml
NO-FQ-5	<i>Candida lusitaniae, Lewia no cultivable</i>	9,4 pg/ml
NO-FQ-6	<i>Basidiomycete no cultivable, S. cerevisiae</i>	7,8 pg/ml

NO-FQ: sujeto sin fibrosis quística; ND: no determinado.

2.3. Colonización bacteriana en sujetos sin fibrosis quística.

En la Tabla nº 22 se muestra la colonización por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* en personas sin enfermedad pulmonar al inicio del trabajo. De los cuatro sujetos en los que se pudo estudiar ésta, lo estaban por *S. pneumoniae*, dos (50%). En ninguno de ellos se observó *P. aeruginosa*.

Los resultados obtenidos al determinar los niveles séricos de betaglucano al inicio del estudio, tanto en los sujetos con *S. pneumoniae* como en los que no se aislaron ninguna de las dos bacterias, se plasman en la Tabla nº 23. En ninguno se superó los 60 pg/ml, siendo las cifras medias de $16,7 \pm 12,6$ y $8,6 \pm 1,1$ respectivamente para cada subgrupo, diferencia no estadísticamente significativa ($p= 0,460$).

Tabla nº 22. Colonización por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* en sujetos sin fibrosis quística al inicio del estudio.

Controles	Colonización bacteriana
NO-FQ-1	ND
NO-FQ-2	ND
NO-FQ-3	
NO-FQ-4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
NO FQ-5	
NO-FQ-6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

NO-FQ: sujeto sin fibrosis quística.

Tabla nº 23. Colonización por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* y niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística al inicio del estudio.

Controles	Colonización bacteriana	Niveles de betaglucano
NO-FQ-1	ND	11,1 pg/ml
NO-FQ-2	ND	8,3 pg/ml
NO-FQ-3		7,8 pg/ml
NO-FQ-4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25,6 pg/ml
NO FQ-5		9,4 pg/ml
NO-FQ-6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7,8 pg/ml

NO-FQ: sujeto sin fibrosis quística.

3. PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

Uno de los siete pacientes con FQ era diabético (FQ-1) y dos tenían tolerancia alterada a la glucosa (FQ-2 y FQ-5), dos de ellos presentaban hepatopatía (FQ-1 y FQ-2) y uno de ellos desnutrición (FQ-2). Uno de ellos presentaba bronquiectasias (FQ-5). Cuatro de ellos habían recibido azitromicina previamente (FQ-1, FQ-2, FQ-5, FQ-6).

3.1. Colonización fúngica en pacientes con fibrosis quística.

En la Tabla nº 24 se puede observar la colonización fúngica en los pacientes con fibrosis quística no sometidos a trasplante pulmonar, se comprueba que al inicio del estudio, se identificaron hongos en el 57,1% de ellos, a los seis meses en el 57,1% y al año en el 85,7% (solamente un enfermo que anteriormente estuvo colonizado sufrió aclaramiento).

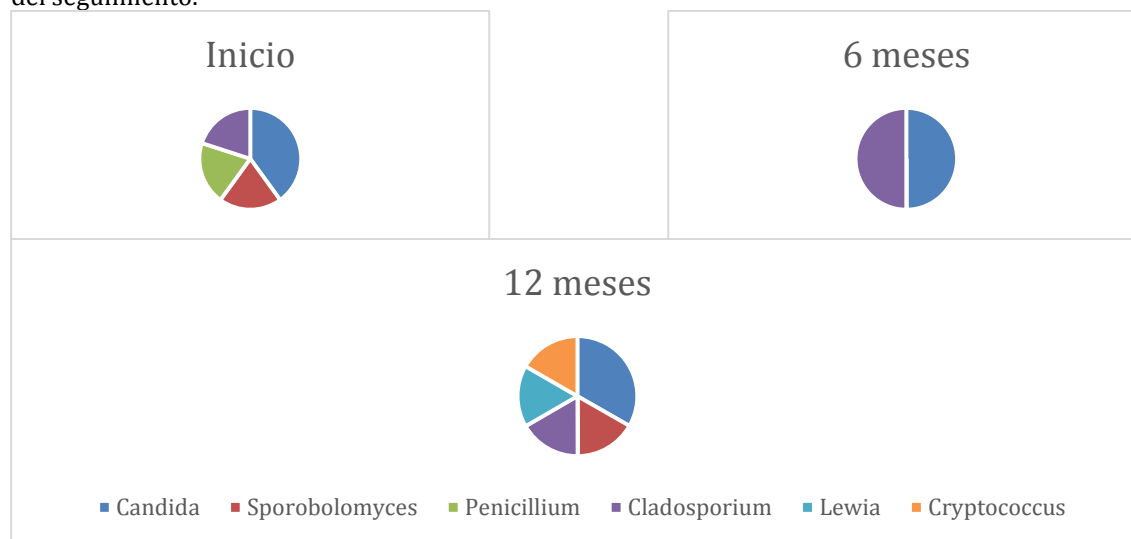
Como se muestra en la tabla los microorganismos aislados se encuadraron en los géneros de la forma siguiente *Candida* (40%), *Cladosporium* (26,7%), *Sporobolomyces* (13,3%) y *Penicilium*, *Lewia* y *Criptococcus* (6,7% cada uno respectivamente). En la figura nº 14 se puede observar su distribución a lo largo del seguimiento.

Tabla nº 24. Colonización fúngica en pacientes con fibrosis quística.

Controles	Inicio	6 meses	12 meses
FQ-1	<i>Candida albicans</i> , <i>Sporobolomyces</i>		<i>Sporobolomyces</i>
FQ-2	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida parapsilosis</i>
FQ-3		<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
FQ-4		<i>Cladosporium</i>	<i>Lewia no cultivable</i>
FQ-5		<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus flavicens</i>
FQ-6	<i>Penicilium</i>	<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	
FQ-7	<i>Cladosporium</i>		<i>Cladosporium</i>

FQ: paciente con fibrosis quística no trasplantado.

Figura nº 14. Distribución de los géneros aislados en los pacientes con fibrosis quística a lo largo del seguimiento.



3.2. Niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística con colonización fúngica.

De los cuatro pacientes colonizados al inicio, en dos (50%) se detectaron valores superiores a 80 pg/ml de betaglucano y que presentaban colonización persistente por *Candida*, *Sporobolomyces* y *Cladosporium*.

A los seis meses, tan sólo uno de los cuatro enfermos en los que se aislaron hongos, presentó niveles de betaglucano superior al dintel diagnóstico, que precisamente estaba colonizado por *Candida*.

A los 12 meses el 16,7% de las personas que padecieron colonizaciones fúngicas, presentó una tasa de betaglucano de 26 pg/ml mientras que el resto osciló entre 241 y 81, coincidiendo las cifras más altas con la presencia de *Sporobolomyces* y *Candida*, aunque no siendo significativo ($p= 0,201$ y $p= 0,367$, respectivamente).

Como se presenta en la Tabla nº 25 dentro del conjunto de las muestras en las que se detectaron hongos, el 57,1% alcanzaron cifras de betaglucano ≥ 80 pg/ml y el 42,9% restante no llegaron a 60 pg/ml, siendo la media de $118,6 \pm 140,5$.

Tabla nº 25. Colonización fúngica y niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística.

Controles	Inicio	6 meses	12 meses
FQ-1	<i>Candida albicans</i> , <i>Sporobolomyces</i> 530 pg/ml		<i>Sporobolomyces</i> 241 pg/ml
FQ-2	<i>Candida albicans</i> 59 pg/ml		<i>Candida parapsilosis</i> 206 pg/ml
FQ-3		<i>Candida albicans</i> 83 pg/ml	<i>Candida albicans</i> 171 pg/ml
FQ-4		<i>Cladosporium</i> 8 pg/ml	<i>Lewia no cultivable</i> 26 pg/ml
FQ-5		<i>Candida albicans</i> 8 pg/ml	<i>Cryptococcus flavescens</i> 124 pg/ml
FQ-6	<i>Penicilium</i> 8 pg/ml	<i>Cladosporium cladosporioides</i> 20 pg/ml	
FQ-7	<i>Cladosporium</i> 95 pg/ml		<i>Cladosporium</i> 81 pg/ml

FQ: paciente con fibrosis quística no trasplantado.

3.3. Colonización bacteriana en pacientes con fibrosis quística.

En la Tabla nº 26 se puede observar la colonización por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* en estos pacientes. Al inicio, uno de ellos con *P. aeruginosa* y otro con *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae*. A los seis meses, esta doble colonización se detecta en otro tercer paciente distinto. Al año, en cuatro afectados se aislaron *P. aeruginosa*, y en uno de éstos además *S. pneumoniae*. De los enfermos positivos al final del estudio, sólo dos lo estaban también al inicio y ninguno a los seis meses.

Tabla nº 26. Colonización por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* en pacientes con fibrosis quística.

Controles	Inicio	6 meses	12 meses
FQ-1			<i>P. aeruginosa</i>
FQ-2	<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. aeruginosa</i>
FQ-3			<i>P. aeruginosa</i>
FQ-4			
FQ-5			
FQ-6		<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i>	
FQ-7	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i>

FQ: paciente con fibrosis quística no trasplantado. *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae*.

En cinco de las siete muestras en las que se aislaron una o ambas bacterias, los niveles de betaglucano sérico fueron ≥ 80 pg/ml y en las restantes inferior a 60 pg/ml (Tabla nº 27), el valor medio fue de $124,7 \pm 82$ y no se correspondieron con una tasa sérica de betaglucano superior, aquellos pacientes que estaban colonizados por las dos especies bacterianas a la vez, pues la media de las muestras en las que se aísla un género de microorganismo fue de $169,3 \pm 78,9$, y la de aquellas en las que se hallaron los dos géneros bacterianos de $65,3 \pm 39,9$ sin existir diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,095$).

Tabla nº 27. Colonización por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* y niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística.

Controles	Inicio	6 meses	12 meses
FQ-1			<i>P. aeruginosa</i> 241 pg/ml
FQ-2	<i>P. aeruginosa</i> 59 pg/ml		<i>P. aeruginosa</i> 206 pg/ml
FQ-3			<i>P. aeruginosa</i> 171 pg/ml
FQ-4			
FQ-5			
FQ-6		<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i> 20 pg/ml	
FQ-7	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i> 95 pg/ml		<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i> 81 pg/ml

FQ: paciente con fibrosis quística no trasplantado. *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae*.

4. PACIENTES TRASPLANTADOS

Cuatro de los once pacientes trasplantados eran diabéticos (TP-3, TP-6, TP-7 y TP-9) y tres tenían tolerancia alterada a la glucosa (TP-4, TP-5 y TP-8). Uno de ellos tenía hepatopatía (transaminasas por encima del doble del límite superior de la normalidad, TP-3). Todos los pacientes excepto uno en el que lo desconocemos (TP-10) habían tomado esteroides orales en los seis meses previos (diariamente o en días alternos). Todos habían recibido inmunosupresores en los últimos seis meses: tacrólimus y azatioprina en seis de ellos (TP-1, TP-2, TP-5, TP-6, TP-8 y TP-9), ciclosporina y azatioprina en dos de ellos (TP-4 y TP-7), tacrólimus y micofenolato en uno (TP-10) y ciclosporina y micofenolato en otro (TP-11); en uno lo desconocemos (TP-3). En cuanto a la cifra de linfocitos, en dos de ellos la cifra de linfocitos era de $1,4 \times 10^9/l$ (TP- 4 y TP-11) y en otro de ellos de $1,5 \times 10^9/l$ (TP-5),

los demás tenían una cifra de linfocitos superior a $1,5 \times 10^9/l$. Todos ellos habían recibido tratamiento con cotrimoxazol durante los seis meses previos, aunque no todos siguieron la misma pauta de profilaxis. Uno de ellos había realizado tratamiento previo con azitromicina (TP-5).

4.1. Colonización fúngica en pacientes trasplantados.

Al inicio del estudio, en todos los sujetos incluidos se detectó colonización por hongos, en el 9,1% de ellos respectivamente se clasificaron dentro de los géneros *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Rhodosporium*, *Rhodotorula* y *Davidiella*, en tanto que en el 18,2% de los intervenidos se asignaron los aislados a *Aspergillus* y *Geotricum* respectivamente y en el 63,6% de los enfermos se identificaron como pertenecientes a *Candida*.

A los seis meses de seguimiento en los nueve pacientes de los que se tenían muestras se detectó colonización fúngica. Continúa siendo el género más frecuentemente encontrado *Candida* (en el 66,7% de los afectados), sigue presente *Cryptococcus* (en el 11,1%) y aparecen otros grupos taxonómicos que se asignaron a los géneros *Alternaria*, *Pleosporaceae*, *Cochiobolus*, *Bipolaris* y *Cladosporium* (en el 11,1% de los enfermos respectivamente).

A los 12 meses de seguimiento, sólo se dispuso de muestras de tres pacientes, todos ellos colonizados, sigue *Candida* presente en todos ellos y aparecen además; en uno *Debaryomyces* y *Kluyveromyces*; en otro *Leucosporidiella* y *Saccharomycetales* y en el tercero *Cladosporium*, *Sporobolomyces* y *Capnodiales*.

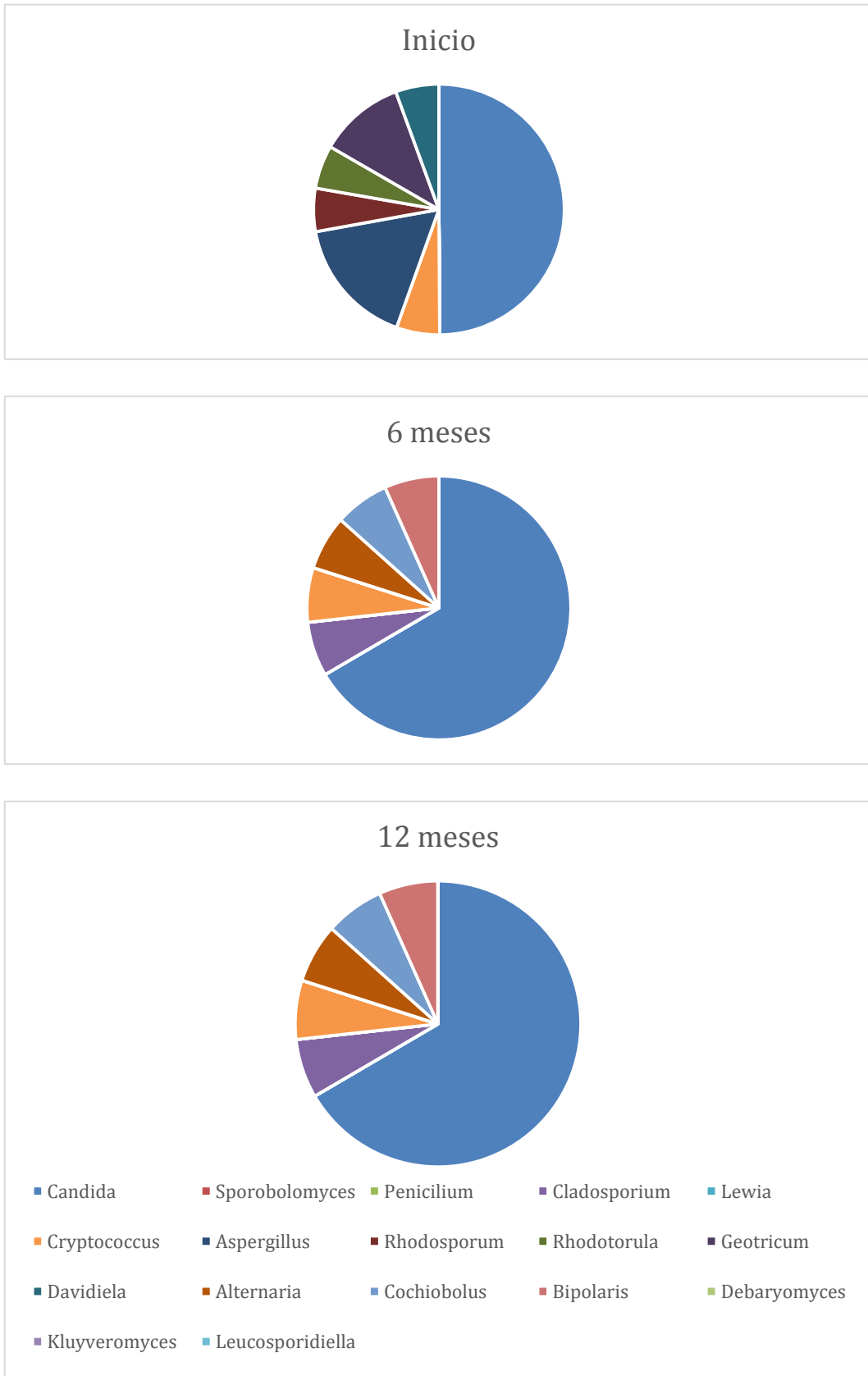
En la Tabla nº 28 se muestran los diferentes hongos encontrados en las muestras tomadas de los 11 pacientes a lo largo del periodo estudiado, debiéndose destacar que en el 43,5% de ellas se aisló un solo género en tanto que el 56,5% restante se identificaron dos o más, siendo *Candida* el que se presentó con mayor frecuencia. En la figura nº 15 se puede observar la distribución de los diferentes géneros a lo largo del seguimiento.

Tabla nº 28. Colonización fúngica en pacientes trasplantados.

Trasplantados	Al inicio	6 meses	12 meses
TP-1	<i>Cryptococcus</i> sp., <i>Candida albicans</i>	ND	ND
TP-2	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	ND
TP-3	<i>Candida albicans</i> , <i>C. deformans</i> , <i>C. zeylanoides</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. deformans</i> , <i>C. apicola</i>	ND
TP-4	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND
TP-5	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND
TP-6	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. deformans</i>	ND
TP-7	<i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus nidulans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. deformans</i> , <i>Debaryomyces no cultivable</i> , <i>Kluyveromyces</i>
TP-8	<i>Rhodosporem</i> sp., <i>Rhodotorula</i> , <i>Geotricum</i>	<i>Pleosporaceae</i> sp., <i>Cochiobolus</i> , <i>Bipolaris oryzae</i>	<i>C. albicans</i> , <i>Leucosporidiella</i> sp., <i>Saccharomycetales no cultivable</i>
TP-9	<i>Davidiela no cultivable</i>	<i>Cladosporium clorosporioides</i> , <i>C. lusitaniae</i>	<i>C. glabrata</i> , <i>Cladosporium clorosporioides</i> , <i>Sporobolomyces</i> sp., <i>Capnodiales</i> sp.
TP-10	<i>Geotricum fragrans</i>	<i>C. albicans</i> , <i>Cryptococcus estepposus</i>	ND
TP-11	<i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus nidulans</i>	ND	ND

TP: paciente con fibrosis quística sometido a trasplante pulmonar; ND: no determinado.

Figura nº 15. Distribución de los géneros aislados en los pacientes trasplantados a lo largo del seguimiento.



4.2. Niveles de betaglucano en pacientes trasplantados con colonización fúngica.

Al inicio del estudio, en los pacientes colonizados por hongos, el 54,5% de ellos presentaron valores superiores a 80 pg/ml de betaglucano, el 9,1% entre 60-79 pg/ml y el 36,4% con cifras inferiores a 60 pg/ml.

A los seis meses de los 9 enfermos cuyas muestras se analizaron, arrojaron cuantías de betaglucano sérico por encima de 80 pg/ml el 55,6%, entre 60-79 pg/ml el 33,3% e inferiores a 60 pg/ml el 11,1%.

Al año de seguimiento se analizaron tres muestras, de las que dos mantenían niveles de betaglucano ≥ 80 pg/ml y la otra < 60 pg/ml.

En la Tabla nº 29 se muestran los datos sobre las determinaciones de betaglucano en los pacientes colonizados, se puede comprobar que se aislaron hongos en las 23 muestras analizadas, que al relacionarlas con los niveles de betaglucano séricos de los enfermos de los que procedían, se demostró que el 56,5% arrojaron cifras superiores a 80 pg/ml, el 17,4% se encontraron entre 60-79 pg/ml y el 26,1% inferiores a 60 pg/ml, siendo los valores medios de $83,6 \pm 33,1$ ($81,6 \pm 31,8$ en el inicio con 11 pacientes, $81,7 \pm 23,1$ a los 6 meses con 9 pacientes y $96,9 \pm 67,2$ al año con tres pacientes), aunque la diferencia entre grupos no es significativa ($p=0,077$).

La cantidad media de betaglucano en las muestras que estaban colonizadas por *Candida* fue de $83,1 \pm 37,2$ y en las que no estaban colonizadas por *Candida* fue de $85,2 \pm 19,4$, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,896$).

Tabla nº 29. Colonización fúngica y niveles de betaglucano en pacientes trasplantados.

Trasplantados	Al inicio	6 meses	12 meses
TP-1	<i>Cryptococcus</i> sp., <i>Candida albicans</i> 55,2 pg/ml	ND	ND
TP-2	<i>Aspergillus</i> sp. 84,8 pg/ml	<i>Alternaria</i> sp. 87,1 pg/ml	ND
TP-3	<i>Candida albicans</i> , <i>C.</i> <i>deformans</i> , <i>C.</i> <i>zeylanoides</i> 83,3 pg/ml	<i>C. albicans</i> , <i>C.</i> <i>deformans</i> , <i>C. apicola</i> 100 pg/ml	ND
TP-4	<i>C. albicans</i> 128 pg/ml	<i>C. albicans</i> 122,7 pg/ml	ND
TP-5	<i>C. albicans</i> 129,5 pg/ml	<i>C. albicans</i> 64,1 pg/ml	ND
TP-6	<i>C. albicans</i> 44,9 pg/ml	<i>C. albicans</i> , <i>C.</i> <i>deformans</i> 95,4 pg/ml	ND
TP-7	<i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> 78,2 pg/ml	<i>C. albicans</i> 66,2 pg/ml	<i>C. albicans</i> , <i>C. deformans</i> , <i>Debaryomyces</i> no cultivable, <i>Kluyveromyces</i> 39,8 pg/ml
TP-8	<i>Rhodosporium</i> sp., <i>Rhodotorula</i> , <i>Geotricum</i> 98 pg/ml	<i>Pleosporaceae</i> sp., <i>Cochiobolus</i> , <i>Bipolaris</i> <i>oryzae</i>) 85,6 pg/ml	<i>C. albicans</i> , <i>Leucosporidiella</i> sp., <i>Saccharomycetales</i> no cultivable 80 pg/ml
TP-9	<i>Davidiella</i> no cultivable 106,3 pg/ml	<i>Cladosporium</i> <i>clorosporioides</i> , <i>C.</i> <i>lusitaniae</i> 68 pg/ml	<i>C. glabrata</i> , <i>Clodosporium</i> <i>clorosporioides</i> , <i>Sporobolomyces</i> sp., <i>Capnodiales</i> sp. 171 pg/ml
TP-10	<i>Geotricum fragrans</i> 49,5 pg/ml	<i>C. albicans</i> , <i>Cryptococcus</i> <i>stepposus</i> 45,9 pg/ml	ND
TP-11	<i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> 40,3 pg/ml	ND	ND

TP: paciente con fibrosis quística sometido a trasplante pulmonar.

4.3. Colonización bacteriana en pacientes trasplantados.

En la siguiente Tabla nº 30 se muestra cómo al inicio, tres enfermos (27,3%) estaban colonizados por *P. aeruginosa* y cinco (45,5%) por *S. pneumoniae* y dos de ellos por ambos.

A los seis meses se detectaron uno o ambos gérmenes en ocho de las nueve muestras disponibles (88,9%), de ellos (cinco por *P. aeruginosa* y seis por *S. pneumoniae*, entre los cuales tres con positividad para ambos en distintos individuos).

Al año, en sólo dos enfermos se investigó la presencia de dichos microorganismos. En uno estaban presentes *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* y en el otro ninguna.

En el total de las muestras, en nueve se aisló *P. aeruginosa* (recogidas en siete de los once pacientes) y en doce *S. pneumoniae* (tomadas en ocho de los once enfermos).

Tabla nº 30. Colonización por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* en pacientes trasplantados.

Trasplantados	Al inicio	6 meses	12 meses
TP-1		ND	ND
TP-2	<i>S. pneumoniae</i> (+)	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (?)	ND
TP-3	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+)	<i>S. pneumoniae</i> (+)	ND
TP-4	<i>S. pneumoniae</i> (+)	<i>P.aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+)	ND
TP-5		<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+)	ND
TP-6		<i>S. pneumoniae</i> (+)	ND
TP-7		<i>P. aeruginosa</i> (+)	
TP-8	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+)	<i>S. pneumoniae</i> (+)	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+)
TP-9			ND
TP-10	<i>P. aeruginosa</i> (+)	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+)	ND
TP-11	<i>S. pneumoniae</i> (+)	ND	ND

TP: paciente con fibrosis quística sometido a trasplante pulmonar.

En los 11 pacientes trasplantados se tomaron y analizaron veintidós muestras. De las que 15 procedían de enfermos colonizados (por una de las dos bacterias o ambas, citadas anteriormente), en diez (66,7%) los niveles de betaglucono fueron

≥ 80 pg/ml, mientras que en tres (20%) alcanzó < 60 pg/ml y en dos (13,3%) entre 60 y 79 pg/ml.

Con respecto a las siete muestras de enfermos sin colonización por ninguno de los dos, en tres los niveles se mantuvieron en < 60 pg/ml, en dos fue entre 60 y 79 y en el resto ≥ 80 pg/ml.

Los niveles medios de betaglucano en todos fueron de 79,67 ± 27,66. Entre los pacientes colonizados por uno de los dos géneros bacterianos fue de 81,88 ± 26,72, en los que lo estaban por ambos fue de 82,3 ± 26,6 y entre los no colonizados por ninguno de ellos de 74,6 ± 33, con diferencias no estadísticamente significativas ($p= 0,852$) (Tabla nº 31).

Tabla nº 31. Colonización por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* y niveles de betaglucano en pacientes trasplantados.

Trasplantados	Al inicio	6 meses	12 meses
TP-1	55,2 pg/ml	ND	ND
TP-2	<i>S. pneumoniae</i> (+) 84,8 pg/ml	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (?) 87,1 pg/ml	ND
TP-3	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+) 83,3 pg/ml	<i>S. pneumoniae</i> (+) 100 pg/ml	ND
TP-4	<i>S. pneumoniae</i> (+) 128 pg/ml	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+) 122,7 pg/ml	ND
TP-5	129,5 pg/ml	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+) 64,1 pg/ml	ND
TP-6	44,9 pg/ml	<i>S. pneumoniae</i> (+) 95,4 pg/ml	ND
TP-7	78,2 pg/ml	<i>P. aeruginosa</i> (+) 66,2 pg/ml	39,8 pg/ml
TP-8	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+) 98 pg/ml	<i>S. pneumoniae</i> (+) 85,6 pg/ml	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+) 80 pg/ml
TP-9	106,3 pg/ml	68 pg/ml	ND
TP-10	<i>P. aeruginosa</i> (+) 49,5 pg/ml	<i>P. aeruginosa</i> (+) <i>S. pneumoniae</i> (+) 45,9 pg/ml	ND
TP-11	<i>S. pneumoniae</i> (+) 40,3 pg/ml	ND	ND

TP: paciente con fibrosis quística sometido a trasplante pulmonar.

5. COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*.

5.1. En sujetos sin fibrosis quística.

En la Tabla nº 32 pueden observarse los datos encontrados sobre la colonización por *P. jirovecii* en los sujetos sin enfermedad pulmonar, sólo dos de ellos lo estaban al inicio del estudio.

Tabla nº 32. Colonización por *P. jirovecii* en los sujetos sin fibrosis quística al inicio del estudio.

Controles	Inicio	6 meses	12 meses
NO-FQ-1	-	ND	ND
NO-FQ-2	-	ND	ND
NO-FQ-3	+	ND	ND
NO FQ-4	-	ND	ND
NO FQ-5	+	ND	ND
NO FQ-6	-	ND	ND

NO-FQ: sujeto sin fibrosis quística; ND: no determinado; Signo +: colonizado (se detecta ADN de *P.jirovecii*); Signo -: no colonizado (no se detecta ADN de *P. jirovecii*).

5.2. Niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística.

Todas las personas sin enfermedad pulmonar tenían unos niveles de betaglucano séricos inferiores a 60 pg/ml (con una media de $11,7 \pm 6,9$) (Tabla nº 33).

En los sujetos con *P. jirovecii* fue de $8,6 \pm 1,1$ y en los que no hubo presencia de este hongo de $13,2 \pm 8,4$, no siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p=0,507$).

Tabla nº 33. Niveles de betaglucano y colonización por *P. jirovecii* en los sujetos sin enfermedad pulmonar.

Controles	Inicio	6 meses	12 meses
NO-FQ-1	(-) 11,1 pg/ml	ND	ND
NO-FQ-2	(-) 8,3 pg/ml	ND	ND
NO-FQ-3	(+) 7,8 pg/ml	ND	ND
NO-FQ-4	(-) 25,6 pg/ml	ND	ND
NO-FQ-5	(+) 9,4 pg/ml	ND	ND
NO-FQ-6	(-) 7,8 pg/ml	ND	ND

NO-FQ: sujeto sin fibrosis quística; ND: no determinado; Signo +: colonizado (se detecta ADN de *P.jirovecii*); Signo -: no colonizado (no se detecta ADN de *P. jirovecii*).

5.3. En pacientes con fibrosis quística.

En la Tabla nº 34 se muestra que en este grupo de pacientes, estaban colonizados por *P. jirovecii* en el periodo inicial el 85,7% (seis de ellos), a los 6 meses también seis de ellos (85,7%) y al año el 42,9% (tres) pues el resto habían presentado aclaramiento.

Tabla nº 34. Colonización por *P. jirovecii* en los pacientes con fibrosis quística.

Controles	Inicio	6 meses	12 meses
FQ-1	+	+	-
FQ-2	+	+	-
FQ-3	+	+	+
FQ-4	+	+	-
FQ-5	-	+	+
FQ-6	+	+	+
FQ-7	+	-	-

FQ: paciente con fibrosis quística no trasplantado; Signo +: colonizado (se detecta ADN de *P.jirovecii*); Signo -: no colonizado (no se detecta ADN de *P. jirovecii*).

5.4. Niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística.

En las diez muestras obtenidas en pacientes colonizados en los que se comprobaron las medidas de betaglucano sérico, la mitad tenían unos niveles de estos superiores a 80 pg/ml y el resto inferior a 60 pg/ml. De las cuatro muestras de enfermos con ausencia de *P. jirovecii*, el 75% de ellas mostraron cifras por encima de 80 pg/ml y el 25% restante por debajo de 60 pg/ml (Tabla nº 35). La media de betaglucano en los pacientes que vehicularon el hongo fue de $110,6 \pm 157,5$ y en los otros de $138,5 \pm 101,7$ sin significación estadística ($p= 0,752$).

Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,460$) si se tiene en cuenta el momento en el que se produjo la colonización (al inicio, a los seis o a los doce meses) siendo la media general de $118,6 \pm 101,7$.

Tabla nº 35. Niveles de betaglucano y colonización por *P. jirovecii* en los pacientes con fibrosis quística.

Controles	Inicio	6 meses	12 meses
FQ-1	(+) 530 pg/ml	(+)	(-) 241 pg/ml
FQ-2	(+) 59 pg/ml	(+)	(-) 206 pg/ml
FQ-3	(+)	(+) 83 pg/ml	(+) 171 pg/ml
FQ-4	(+)	(+) 8 pg/ml	(-) 26 pg/ml
FQ-5	(-)	(+) 8 pg/ml	(+) 124 pg/ml
FQ-6	(+) 8 pg/ml	(+) 20 pg/ml	(+)
FQ-7	(+) 95 pg/ml	(-)	(-) 81 pg/ml

FQ: paciente con fibrosis quística no trasplantado; Signo +: colonizado (se detecta ADN de *P.jirovecii*); Signo -: no colonizado (no se detecta ADN de *P. jirovecii*).

5.5. En pacientes trasplantados y sus genotipos.

En cuanto a la colonización por *P. jirovecii* en estos enfermos, en la Tabla nº 36 puede observarse que estaban colonizados al inicio cinco de los once (45,5%), a los seis meses, cuatro (36,4%) y al año, seis (54,5%) a pesar de la quimioprofilaxis con cotrimoxazol.

En la Tabla nº 37 se muestran los genotipos del agente encontrado en las 10 muestras analizadas. El 1 se observó en una, el 2 en dos (ambas extraídas del mismo individuo) y el 3 en siete de ellas, pero en ninguno de los enfermos hubo colonización por dos genotipos distintos. Finalmente es necesario precisar que no fue posible hacer el genotipado en cinco de las muestras extraídas de pacientes colonizados.

Tabla nº 36. Colonización por *P. jirovecii* en pacientes trasplantados.

Pacientes trasplantados	Inicio	6 meses	12 meses
TP-1	+	-	-
TP-2	-	+	+
TP-3	+	-	+
TP-4	+	-	-
TP-5	-	-	-
TP-6	-	+	-
TP-7	-	-	+
TP-8	-	-	+
TP-9	+	+	+
TP-10	+	-	+
TP-11	-	+	-

TP: paciente con fibrosis quística sometido a trasplante pulmonar; Signo +: colonizado (se detecta ADN de *P. jirovecii*); Signo -: no colonizado (no se detecta ADN de *P. jirovecii*).

Tabla nº 37. Polimorfismos de *P. jirovecii* en pacientes trasplantados.

Pacientes trasplantados	Inicio	6 meses	12 meses
TP-1	GENOTIPO 3	-	-
TP-2	-	GENOTIPO 3	GENOTIPO 3
TP-3	GENOTIPO 3	-	GENOTIPO 3
TP-4	+	-	-
TP-5	-	-	-
TP-6	-	+	-
TP-7	-	-	GENOTIPO 3
TP-8	-	-	+
TP-9	GENOTIPO 2	GENOTIPO 2	+
TP-10	GENOTIPO 1	-	+
TP-11	-	GENOTIPO 3	-

TP: paciente con fibrosis quística sometido a trasplante pulmonar; Signo +: colonizado (se detecta ADN de *P. jirovecii*); Signo -: no colonizado (no se detecta ADN de *P. jirovecii*).

5.6. Niveles de betaglucano en pacientes trasplantados.

De las once muestras obtenidas en los enfermos que sufrieron colonización y en las que hubo disponibilidad para detección de betaglucano, siete (63,6%) tuvieron niveles ≥ 80 pg/ml, tres (27,3%) inferior a 60 y una (9,1%) entre 60 y 79 pg/ml. Entre las doce muestras procedentes de pacientes sin colonizar, en los que se pudo determinar estos niveles, estuvieron por debajo de 60 pg/ml en cuatro (33,3%), en ≥ 80 pg/ml en cinco (41,7%) y en tres (25%) se situaron entre 60 y 79 pg/ml (Tabla nº 38). La media de betaglucano en el conjunto fue de $80,3 \pm 36,6$, en tanto que en los pacientes trasplantados con presencia de *P. jirovecii* de $87,6 \pm 37,7$ y en los que no se detectó este hongo de $73,6 \pm 35,7$, aunque sin ser diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,371$). La media de betaglucano en pacientes colonizados al inicio fue de $84,5 \pm 33,4$, a los seis meses de $83,5 \pm 14,1$, y al año de $96,9 \pm 67,2$. No hubo significación estadística en función del momento en el que se produjo la colonización (al inicio, a los seis o a los doce meses, $p= 0,902$).

Tabla nº 38. Niveles de betaglucano y colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes trasplantados.

Pacientes trasplantados	Inicio	6 meses	12 meses
TP-1	(+) 55,2 pg/ml	(-)	(-)
TP-2	(-) 84,8 pg/ml	(+) 87,1 pg/ml	(+)
TP-3	(+) 83,3 pg/ml	(-) 100 pg/ml	(+)
TP-4	(+) 128 pg/ml	(-) 122,7 pg/ml	(-)
TP-5	(-) 129,5 pg/ml	(-) 64,1 pg/ml	(-)
TP-6	(-) 44,9 pg/ml	(+) 95,4 pg/ml	(-)
TP-7	(-) 78,2 pg/ml	(-) 66,2 pg/ml	(+) 39,8 pg/ml
TP-8	(-) 98 pg/ml	(-) 8,6 pg/ml	(+) 80 pg/ml
TP-9	(+) 106,3 pg/ml	(+) 68 pg/ml	(+) 171 pg/ml
TP-10	(+) 49,5 pg/ml	(-) 45,9 pg/ml	(+)
TP-11	(-) 40,3 pg/ml	(+)	(-)

TP: paciente con fibrosis quística sometido a trasplante pulmonar; Signo +: colonizado (se detecta ADN de *P.jirovecii*); Signo -: no colonizado (no se detecta ADN de *P. jirovecii*).

6. PRINCIPALES AISLAMIENTOS Y NIVELES DE BETAGLUCANO.

6.1. En pacientes con fibrosis quística

En la Tabla nº 39 se pueden observar el número de muestras procedentes de los pacientes con FQ en las que se se aíslan los microorganismos y los niveles medios de betaglucano correspondientes a cada uno de ellos. En ninguno se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas.

Tabla nº 39. Betaglucano en pacientes con fibrosis quística.

Colonización	Muestras (n)	Betaglucano (pg/ml)	P
<i>P. jirovecii</i>	Sí (10)	110,6 ± 157,5	p= 0,752
	No (4)	138,5 ± 101,7	
<i>C. albicans</i>	Sí (5)	170,2 ± 209,6	p= 0,325
	No (9)	89,9 ± 86,6	
<i>Candida no albicans</i>	Sí (1)	206	p= 0,540
	No (13)	111,9 ± 143,8	
<i>P. aeruginosa</i>	Sí (7)	124,7± 82	p= 0,878
	No (7)	112,4 ± 189,5	
<i>S. pneumoniae</i>	Sí (3)	65,3 ± 39,9	p= 0,481
	No (11)	133,1 ± 155,7	

6.2. En pacientes trasplantados

En la Tabla nº 40 se puede observar el número de muestras procedentes de los pacientes trasplantados en las que se aísla cada género bacteriano o fúngico y su relación con los niveles medios de betaglucano sérico. En ningún caso se obtienen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla nº 40. Betaglucano en pacientes trasplantados.

Colonización	Muestras (n)	Betaglucano (pg/ml)	P
<i>P. jirovecii</i>	Sí (11)	87,6 ± 37,7	p= 0,371
	No (12)	73,6 ± 35,7	
<i>C. albicans</i>	Sí (15)	78,2 ± 31,4	p= 0,293
	No (8)	95,8 ± 35,8	
<i>Candida no albicans</i>	Sí (6)	92,9 ± 44	p= 0,437
	No (17)	80,4 ± 29,2	
<i>P. aeruginosa</i>	Sí (9)	77,4 ± 24,2	p= 0,759
	No (13)	81,2 ± 30,7	
<i>S. pneumoniae</i>	Sí (12)	85,7 ± 25,6	p= 0,244
	No (9)	70,8 ± 29,8	

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS ENCONTRADOS.

Mediante el estudio del LOF en personas sin enfermedad pulmonar, en afectados de FQ y en pacientes trasplantados de pulmón por FQ (usando técnicas moleculares como se describió anteriormente), hemos encontrado 20 géneros y 26 especies de hongos.

También se han buscado la presencia de dos especies bacterianas: *P. aeruginosa* por su papel patogénico establecido en FQ y *S. pneumoniae* por su frecuencia.

Para la obtención del LOF, en nuestro caso los participantes realizaron un minuto de gargarismos con 10 ml de suero fisiológico estéril al 0,9% en lugar de 15 ml de solución buffer fosfato salino (PBS) utilizada para el estudio de la microbiota oral en personas sanas en el estudio de Ghannoum *et al.* (2010).

En otros trabajos se han utilizado muestras respiratorias distintas como el esputo (Delhaes *et al.*, 2012; Sibley *et al.*, 2011 y Van Daele *et al.*, 2005) o el LBA (Liu *et al.*, 2009a; Silveira *et al.*, 2008 y Pederiva *et al.*, 2012), pero el LOF utilizado por primera vez por Wakefield *et al.* (1993) aporta las ventajas de ser relativamente fácil de obtener y ser un método no invasivo.

Además, la cavidad oral es la mayor puerta de entrada para los microorganismos en el cuerpo y el enjuague permite la recogida de los agentes presentes en el dorso de la lengua y la mucosa oral.

Brown *et al.* (2014) afirmaron que el LOF representaba pobremente la microbiota pulmonar y también Matos *et al.* (2001) sostuvieron que fue menos útil que el esputo para detectar *P. jirovecii* en pacientes con neumonía con baja carga parasitaria. Sin embargo, Nieves Respaldiza *et al.* (2006) en su estudio de portadores de *P. jirovecii* mediante PCR del LOF encontraron una concordancia del 84,4% con el esputo y del 80% con el LBA para *P. jirovecii*.

El LOF podría tener un alto valor predictivo positivo, pues si encontramos un microorganismo patógeno en la cavidad orofaríngea de estos pacientes, probablemente esté presente también en las vías respiratorias inferiores, lo que

resulta de gran utilidad a la hora de poder establecer pautas de profilaxis en los pacientes trasplantados en situación de inmunosupresión.

En el análisis de la microbiota el problema principal recae en la dificultad de diferenciar especies del mismo género. Para solventarlo se ha propuesto el estudio de la región ITS ya que ésta tiene áreas muy conservadas filogenéticamente y áreas de gran variabilidad interespecífica (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Las regiones ITS han sido las más utilizadas en los últimos años para la identificación del ADN fúngico y utilizadas en estudios de filogenia y taxonomía a partir de todo tipo de muestras, desde ambientales hasta clínicas. Esta región presenta gran especificidad en la identificación de las diferentes especies fúngicas, aún siendo éstas muy cercanas filogenéticamente (Schoch *et al.*, 2012).

2. CONTROLES SIN FIBROSIS QUÍSTICA.

2.1. Colonización fúngica en sujetos sin fibrosis quística.

En las cuatro personas sin enfermedad pulmonar en las que se analizó el LOF al inicio del estudio se aislaron hongos, en total 5 géneros fúngicos, encontrando en cada una de ellas dos géneros distintos. Los predominantes fueron *Candida* y *Saccharomyces*, seguidos de *Cladosporium*, *Debaryomyces* no cultivable, *Lewia* no cultivable y *Basidiomycete* no cultivable en la misma proporción y las especies *C. lusitaniae* y *S. cerevisiae*. Por tanto los géneros no cultivables fueron los que predominaron, seguidos de *Candida* y *Saccharomyces* y por último por *Cladosporium*.

Nuestros resultados coinciden con los de Ghannoum *et al.* (2010), el primer estudio que analizó la microbiota oral de individuos sanos utilizando el LOF de 20 sujetos mediante amplificación de la región ITS, donde los géneros predominantes fueron los no cultivables seguidos de *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium* y *Saccharomycetales*. Dentro de los que *C. albicans* fue la más frecuente seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. khmerensis* y *C. metapsilosis*. En dicho trabajo se identificaron 101 especies diferentes y el rango de éstas en cada individuo estuvo entre 9 y 23.

Al no disponer de la colonización fúngica de dichas personas ni a los seis ni a los doce meses, desconocemos su evolución en el tiempo.

2.2. Niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística con colonización fúngica.

A todos los sujetos se les extrajo una muestra de sangre periférica para la determinación de los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano mediante el test Fungitell®, que está diseñado para el diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas.

Sus resultados se expresan en pg/ml de suero con un rango entre >31 pg/ml y <500 pg/ml. Los valores de (1→3)-β-D-glucano inferiores a 60 pg/ml se interpretan como negativos y como positivos ≥80 pg/ml, aunque cifras superiores a ésta no definen la presencia de enfermedad, por ello se debe utilizar junto con criterios clínicos para establecer un diagnóstico. Además valores entre 60 y 79 pg/ml indican una posible infección fúngica, por lo que se recomiendan pruebas adicionales.

En todos los sujetos los niveles séricos de betaglucano fueron negativos para infección fúngica invasiva. El que lo mostró más alto (25,6 pg/ml) estaba colonizado por *Debaryomyces* no cultivable y *Candida* sp., con una significación estadística para *Debaryomyces* no cultivable. Entre los aislamientos no hemos encontrado *Zygomycetes* (*Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*) que no tienen (1→3)-β-D-glucano o *Cryptococcus* que tienen niveles muy bajos y por tanto podrían dar lugar a falsos negativos. Así mismo es preciso indicar que los pacientes no estaban bajo tratamiento antifúngico que pudiera ser también causa de falsos negativos (Alexander *et al.*, 2010).

Nuestros datos indican por tanto que la determinación de los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano es útil para descartar la presencia de infección fúngica invasiva en población general, pero no para identificar la presencia de colonización.

2.3. Colonización bacteriana en sujetos sin fibrosis quística.

En los sujetos sin enfermedad pulmonar en los que pudimos buscar la presencia de *P. aeruginosa* o *S. pneumoniae*, no encontramos colonización por *P. aeruginosa* pero sí por *S. pneumoniae* en dos de los cuatro sujetos. En uno de ellos, *S. pneumoniae* se

aisló junto a *Candida* y *Debaromyces*. En el otro se asoció a *S. cerevisiae* y *Basidiomycete*. No disponemos de los datos de colonización de dichas personas ni a los seis ni a los doce meses por lo que no se ha analizado la dinámica evolutiva.

En cuanto a los niveles séricos de betaglucano, en todas las personas fueron negativos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los colonizados por *S. pneumoniae* y los no colonizados, a pesar de que la infección por *S. pneumoniae* está descrita como causa de falso positivo (Alexander *et al.*, 2010).

3. PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA.

3.1. Colonización fúngica en pacientes con fibrosis quística.

Al inicio de nuestro estudio presentaban colonización fúngica el 57% de los pacientes, proporción que se mantuvo a los seis meses y a los doce todos estaban colonizados (sólo uno de ellos dejó de estarlo) por lo que se podría plantear que con el tiempo los pacientes con FQ experimentan un ciclo continuo de colonización y aclaramiento.

El género fúngico más frecuentemente encontrado fue *Candida*, que ha sido descrito como un agente con poco potencial patogénico para las infecciones crónicas de las vías aéreas de pacientes con FQ o las exacerbaciones pulmonares (Gilligan, 2014). Concretamente *C. albicans*, presente en cinco muestras de nuestros pacientes con FQ, se ha considerado un agente con elevada cronicidad y patogenicidad aún no bien conocida en FQ. En cambio, *C. parapsilosis*, detectada por nosotros en una muestra, se considera un agente con baja cronicidad y patogenicidad bien establecida (Chmiel *et al.*, 2014).

Estos resultados coinciden con el análisis retrospectivo de los cultivos microbiológicos de 55 pacientes pediátricos (62% de ellos con FQ) previamente citado (Liu *et al.*, 2009a) donde las especies de *Candida* fueron los colonizadores más frecuentes previamente al trasplante, seguidos de *Aspergillus*, encontrándose también *Scedosporium* y *Basidiomycete*. Los géneros *Cladosporium*, *Sporobolomyces*, *Penicilium*, *Lewia* y *Cryptococcus*, hallados en nuestros pacientes, no han sido descritos por otros autores como colonizadores de pacientes con FQ.

En una única de las muestras se aisló más de un género fúngico a la vez, correspondiente al único paciente (FQ-1) que padecía diabetes mellitus (DM). Tres de los siete pacientes con FQ padecían DM o alteración de la tolerancia a la glucosa (FQ-1, FQ-2 y FQ-5) y en ellos se encontraron cuatro géneros fúngicos (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *Sporobolomyces* y *Cryptococcus flavicens*) al igual que en los pacientes que no padecían alteración del metabolismo de la glucosa (*C. albicans*, *Cladosporium*, *Lewia* y *Penicillium*). La única especie fúngica que se encontró en ambos grupos fue *C. albicans*.

3.2. Niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística con colonización fúngica.

El 57% de las muestras colonizadas se correspondieron con un nivel sérico de betaglucano positivo para infección fúngica invasiva, mientras que el 43% restante arrojó un resultado negativo.

Entre los géneros aislados en las muestras con resultado positivo de betaglucano se encuentra *Cryptococcus flavicens*, a pesar de que *Cryptococcus* tiene niveles bajos de (1→3)-β-D-glucano en su pared.

Dos géneros, *Candida* y *Cladosporium*, se han aislado tanto en las muestras correspondientes a un resultado positivo de betaglucano como a un resultado negativo.

En la bibliografía consultada no se han encontrado investigaciones acerca del uso de (1→3)-β-D-glucano para detectar colonización fúngica en pacientes con FQ, aunque sí en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y neumonía intersticial relacionada con colágeno, para evaluar la utilidad de (1→3)-β-D-glucano como marcador de la colonización por *P. jirovecii* (Shimizu *et. al*, 2009).

3.3. Colonización bacteriana en pacientes con fibrosis quística.

En el 33% de las muestras encontramos colonización bacteriana por una o ambas de las especies buscadas.

La más frecuente fue *P. aeruginosa* que estuvo presente en todas, y en tres de ellas además *S. pneumoniae*. Cinco de los pacientes estuvieron colonizados por *P.*

aeruginosa en algún momento del seguimiento y dos pacientes por *S. pneumoniae*, lo que indica una dinámica de colonización y aclaramiento de estas especies bacterianas a lo largo del seguimiento.

Los pacientes con DM (FQ-1) o alteración de la tolerancia a la glucosa (FQ-2 y FQ-5) no estuvieron colonizados por *S. pneumoniae*. El paciente con bronquiectasias (FQ-5) no sufrió colonización por ninguna de las dos especies bacterianas, lo que puede resultar paradójico teniendo en cuenta que se considera que los pacientes con bronquiectasias tienen un alto riesgo de colonización bacteriana. Sin embargo, recientemente en una cohorte de 121 pacientes con bronquiectasias sin FQ solo un 20,6% de los pacientes presentaban colonización por *P. aeruginosa* (Borekci, Halis, Aygun & Musellim, 2016).

La presencia bacteriana se asoció a *Candida* en tres muestras (dos con *C. albicans* y una con *C. parapsilosis*), a *Cladosporium* en otras tres, y a *Sporobolomyces* en otra. En ninguna hubo presencia bacteriana sin colonización fúngica.

Entre las coinfecciones descritas en las vías aéreas de pacientes con FQ, *Candida* se ha asociado con *P. aeruginosa* (Harrison, 2007) favorecido porque el oxígeno reducido en el pulmón de pacientes con FQ promueve el crecimiento de *P. aeruginosa* (Yoon *et al.*, 2002) y otras bacterias anaerobias, así como de *C. albicans* (Dumitru *et al.*, 2007), por lo que pueden formar un biofilm en consorcio. En nuestro trabajo *C. albicans* se ha asociado a *P. aeruginosa* en el 40% de las muestras, en menor proporción que en el trabajo de Delhaes *et al.* (2012) en el que *C. albicans* se asoció con *P. aeruginosa* en el 80% de los casos. Debemos de resaltar que no se había descrito hasta ahora la co-colonización con *Cladosporium* o *Sporobolomyces*.

En el 71% de las muestras en las que está presente *P. aeruginosa* los niveles de betaglucano sérico son positivos para infección fúngica invasiva y en el 29% restante es negativo. Estos resultados están en consonancia con el trabajo de Mennink-Kersten *et al.* (2008) en el que se observa que la infección por *P. aeruginosa* eleva los niveles de (1→3)-β-D-glucano, pudiendo ser causa de falso positivo. Tres de esas muestras tienen co-colonización por *S. pneumoniae*, que también tiene (1→3)-β-D-glucano por lo que puede ser causa de falso positivo

(Alexander *et al.*, 2010). Sin embargo, la muestra correspondiente con el mayor valor de betaglucano no presentó colonización por ninguno de los dos gérmenes.

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las muestras colonizadas por una o por ambas especies bacterianas.

Nuestros datos indican por tanto que la determinación de los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano no resulta útil para el diagnóstico de infección fúngica invasiva en pacientes con FQ ya que muestra valores elevados en sujetos que no tienen este tipo de infección.

4. PACIENTES TRASPLANTADOS.

4.1. Colonización fúngica en pacientes trasplantados.

En todas las muestras analizadas procedentes de los pacientes trasplantados encontramos colonización fúngica (en total 18 géneros diferentes), desde un mínimo de uno hasta un máximo de cuatro distintos. En las muestras disponibles pertenecientes a los pacientes sin alteración del metabolismo de la glucosa (T-1, TP-2, TP-10 y TP-11) hemos encontrado uno o dos géneros distintos. En las muestras disponibles pertenecientes a los pacientes con DM o alteración de la tolerancia a la glucosa (TP-3, TP-4, TP-5, TP-6, TP-7, TP-8 y TP-9) hemos encontrado desde uno a cuatro géneros distintos, lo que podría sugerir una mayor predisposición a la colonización por un mayor número de géneros fúngicos en este subgrupo de pacientes. En este sentido, está bien establecido que la DM por si sola incrementa el riesgo de padecer infecciones pulmonares. Así los pacientes diabéticos tienen un riesgo 4-5 veces superior de desarrollar tuberculosis que los pacientes no diabéticos. La diabetes, sobre todo cuando no hay un buen control metabólico, predispone a sufrir infecciones fúngicas, principalmente candidiasis y mucormicosis (Poradzka, Jasik, Karnafel & Fiedor, 2013; Klekotka, Mizgała & Król, 2015).

El género más frecuente fue *Candida* (presente en el 73% de las muestras), tanto al inicio como a los seis y a los doce meses. El segundo por orden de frecuencia fue *Aspergillus* (en el 13% de las muestras) y en tercer lugar *Cryptococcus* y

Cladosporium, detectado cada uno en el 8% de las muestras. El resto de géneros (*Alternaria*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodosporium*, *Rhodotorula*, *Pleosporaceae*, *Cochiobolus*, *Bipolaris*, *Leucosporidiella*, *Saccharomycetales*, *Davidiella*, *Sporobolomyces*, *Capnodiales* y *Geotricum*) fueron identificados cada uno de ellos en el 4% de las muestras.

Dentro de *Cándida*, la especie más predominante fue *C. albicans* en 15 muestras, seguida de *C. deformans* en cuatro y *C. zeylanoides*, *C. apícola* y *C. glabrata* en una respectivamente. A los doce meses sólo contamos con tres muestras, colonizadas por tres o cuatro géneros, lo que podría indicar que con el tiempo aumenta el número de taxones presentes en estos pacientes.

Nuestros resultados coinciden con el trabajo de Liu *et al.* (2009a) realizado con 55 pacientes pediátricos (de ellos 62% con FQ), en el que el colonizador postrasplante más frecuente fue *Candida* y dentro de éste *C. albicans* seguido de *Aspergillus*. También encontraron *Basidiomycetes*, *Paelomyces* y *Scedosporium*, utilizando métodos de cultivo en LBA.

Así mismo Helmi *et al.* (2003) vieron una colonización postrasplante por *Aspergillus* en 10 de 32 (31%) pacientes trasplantados por FQ, en tanto que en nuestro trabajo lo sufrieron el 13%. Se ha descrito que la colonización de las vías respiratorias bajas en adultos, en el primer año tras la intervención, es del 30 al 40% (Helmi *et al.*, 2003) frente al 60% en pacientes pediátricos (Liu *et al.*, 2009a). Este tipo de colonización se considera un factor de riesgo significativo para la aspergilosis invasiva, pero ninguno de nuestros pacientes sufrió dicha entidad nosológica en el periodo de seguimiento.

El tratamiento previo con azitromicina se ha considerado como un factor predictivo para la sensibilización por *Aspergillus* (Fillaux *et al.*, 2014), sin embargo en nuestro trabajo hemos encontrado colonización por *Aspergillus* en tres pacientes que no habían recibido azitromicina previamente.

Por otra parte, en el trabajo realizado por Silveira *et al.* (2008), en el que el 6% de los trasplantados lo era por FQ, *Cladosporium* fue el género más frecuente entre los hongos filamentosos distintos al *Aspergillus*, género que en nuestras muestras ha ocupado el tercer lugar junto con *Cryptococcus*.

Las infecciones fúngicas que más se detectan en el primer mes postrasplante son; *Candida* o *Aspergillus* y del segundo al sexto *Aspergillus* o *P. jirovecii* y a partir de este mes *Aspergillus* (Hirche *et al.*, 2014), aunque en nuestro estudio encontramos colonización por *Aspergillus* sólo al inicio del seguimiento. En el trabajo de Danziger-Isakov *et al.* (2008) sobre 555 pacientes pediátricos trasplantados por FQ y otras causas, las infecciones fúngicas pulmonares en el primer año postrasplante fueron causadas por *Aspergillus* (la más frecuente *A. fumigatus*), seguidas de *Candida* (la especie más común *C. albicans*) así como *Paecilomyces*, *Penicilium* y *Scedosporium*.

Como comentamos anteriormente, el espectro de las infecciones está cambiando, pues inicialmente predominaba *Candida* que está empezando a ser sustituida por *Aspergillus* seguida de *Scedosporium*, *Zygomycetes* y *Cryptococcus*, aunque nosotros no hemos encontrado ni *Scedosporium* ni *Zygomycetes*, pero sí *Cryptococcus* en dos muestras.

4.2. Niveles de betaglucano en pacientes trasplantados con colonización fúngica.

En nuestro trabajo el 73% de las muestras que procedían de pacientes trasplantados con colonización fúngica, arrojaron valores de betaglucano superior a 60 pg/ml y el 57% de ellas superiores a 80 pg/ml. Estos resultados están en consonancia con el trabajo de Alexander *et al.* (2010) sobre 73 trasplantados pulmonares (14 de ellos con FQ) en el que el 92% de los no afectados de infección fúngica invasiva mostraron unas cifras de betaglucano superiores a 60 pg/ml y el 90% de ellos al menos 80 pg/ml.

Hay que tener en cuenta publicaciones que incluyen entre las causas que pueden dar lugar a falsos positivos a que el betaglucano es ubicuo, la mala manipulación, la hemodiálisis con membranas de celulosa, la exposición a material quirúrgico (gasas), la presencia de bacteriemia, la administración reciente de albúmina, el uso de productos con inmunoglobulinas y el tratamiento intravenoso con un inhibidor de betalactámico, por lo que la medida del betaglucano sérico puede ser

cuestionada para detectar la colonización fúngica en pacientes trasplantados (Alexander *et al.*, 2010).

Entre nuestros aislamientos no detectamos los del género *Zygomycetes* (*Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*) que no tienen (1→3)-β-D-glucano, que podría ser causa de falso negativo, pero sí está presente *Cryptococcus*, que tiene niveles muy bajos, en dos muestras con valores de betaglucano negativos.

4.3. Colonización bacteriana en pacientes trasplantados.

Encontramos *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* o ambas, en 15 de las 22 muestras estudiadas (68%), ésta última con una mayor frecuencia (en 12) que la primera (en 9), en ocho pacientes frente a siete respectivamente. En nueve muestras hubo colonización por un género y en seis por ambos.

La colonización bacteriana inicial, en todos los casos sufrió variaciones a los seis meses; la presencia de *P. aeruginosa* se mantiene en un caso y *S. pneumoniae* en tres. En los dos pacientes de los que disponemos del análisis de las tres muestras a lo largo del tiempo, también se modifica a los seis y a los doce meses.

Entre los patógenos bacterianos implicados en las infecciones en el primer año postrasplante están las *Pseudomonas* (desde el primer mes y mantenida después de los seis) (Hirche *et al.*, 2014). En el trabajo realizado por Bonvillain *et al.* (2007) los pacientes con FQ trasplantados tuvieron frecuencias más altas de infecciones por *Pseudomonas* y menos tiempo sin estos procesos infecciosos que el resto. En nuestro trabajo hemos encontrado mayor frecuencia de colonización por *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ que en los pacientes trasplantados. Se ha descrito que la cirugía de los senos paranasales y la ducha diaria nasal reducen la colonización por *Pseudomonas* de las vías aéreas en receptores de trasplante pulmonar (Vital *et al.*, 2013a) lo que puede ser trascendente pues la infección crónica por *P. aeruginosa* constituye un factor de riesgo significativo para el desarrollo de poliposis nasal tras la intervención quirúrgica (Vital *et al.*, 2013b).

En el conjunto de las muestras por nosotros estudiadas, *P. aeruginosa* aparece en asociación con *Geotricum fragrans*, *Alternaria* sp. y *C. albicans*. Por otro lado, *S. pneumoniae* se asocia con *Aspergillus* sp., *C. albicans*, *C. deformans*, *C. apicola*,

Pleosporaceae sp., *Cochiobolus*, *Bypolarisoryzae*. Ambas especies bacterianas aparecen en conjunción con *C. albicans*, *C. deformans*, *C. zeylanoides*, *Rhodosporum* sp., *Rhodotorula*, *Geotricum*, *Cryptococcus stepposus*, *Leucosporidiella* sp. Y *Saccharomycetales* no cultivable.

En los pacientes trasplantados podría observarse también una asociación entre *C. albicans* y *P. aeruginosa*, como ya se ha descrito previamente en pacientes con FQ, favorecido porque el oxígeno reducido en el pulmón de pacientes con FQ promueve el crecimiento de *P. aeruginosa* (Yoon *et al.*, 2002) y otras bacterias anaerobias, así como de *C. albicans* (Dumitru *et al.*, 2007), por lo que pueden formar un biofilm en consorcio.

De las muestras con colonización bacteriana, el 80% tenían unos niveles de betaglucano superiores a 60 pg/ml y el 67% superior a 80 pg/ml, es decir, positivo para infección fúngica invasiva. De las muestras no colonizadas, el 43% presentaron niveles de betaglucano negativos.

Como ya comentamos anteriormente, la infección por *S. pneumoniae* y *P. aeruginosa* pueden elevar los niveles de (1→3)-β-D-glucano (Mennink-Kersten *et al.*, 2008).

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de betaglucano correspondientes a la colonización por uno, dos géneros o ausencia de colonización bacteriana.

5. COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*.

Se analiza separadamente este tipo de colonización debido a que *P. jirovecii* reúne unas características específicas, que hacen que exista un acuerdo general de los autores, para considerarlo un hongo atípico, tal como hemos reflejado en el apartado de introducción de esta tesis.

5.1. En sujetos sin fibrosis quística.

En este trabajo los sujetos sin enfermedad pulmonar se utilizaron solo como controles y no hubo seguimiento de los mismos. El 33% presentaba colonización

por *P. jirovecii*, pero este dato no es representativo porque los sujetos no fueron seleccionados al azar, sino que se seleccionaron de estudios previos para que hubiera sujetos con y sin colonización por *Pneumocystis*.

Resulta interesante, que ninguno de los sujetos portadores de *S. pneumoniae* presentaban colonización por *P. jirovecii*, lo que podría constituir un antagonismo entre ambos, al igual que se ha sugerido entre *P. jirovecii* y *P. aeruginosa* en pacientes con FQ (Hernández-Hernández *et al.*, 2012).

5.2. Niveles de betaglucano en sujetos sin fibrosis quística.

Todos los sujetos (colonizados o no) arrojaron unos niveles séricos de betaglucano inferiores a 60 pg/ml, es decir, negativos, sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Cifras menores de 60 pg/ml en ausencia de sintomatología supone un valor predictivo negativo para PcP entre 65,1% y 85,1% usando el test Fungitell® como se describe en el apartado de material y métodos de esta tesis.

5.3. En pacientes con fibrosis quística.

En nuestro trabajo, al inicio y a los seis meses el 85,7% de los pacientes de FQ estaban colonizados por *P. jirovecii*, manteniéndola el 42,9% a los doce. El enfermo que estaba libre al principio, sufrió colonización posterior. Al año, cuatro pacientes presentaron aclaramiento. Todos ellos estuvieron colonizados en algún momento del seguimiento, lo que refleja la existencia de un ciclo continuo de colonización y aclaramiento por *P. jirovecii* en estos pacientes que ya se había evidenciado en estudios previos (Montes-Cano *et al.*, 2007).

Las prevalencias de colonización que hemos encontrado son superiores a las descritas por Respaldiza *et al.* (2005), en cuyo trabajo analizaron muestras de esputo y LOF mediante PCR anidada y hallaron una prevalencia de colonización por *P. jirovecii* del 21,6% en pacientes con FQ en España, concretamente 25,5% en menores de 18 años y 15,1% en el resto.

La utilidad del LOF para identificar a los portadores de *P. jirovecii* mediante PCR fue descrita por esta misma autora quien encontró una concordancia del 84,4%

con los resultados de las investigaciones del agente en esputos y del 80% en LBA (Respaldiza *et al.*, 2006).

Algunos trabajos han publicado que la azitromicina es eficaz para la profilaxis frente a *P. jirovecii* (Dunne *et al.*, 1999), sin embargo en nuestro trabajo tres de los cuatro (75%) pacientes con FQ que habían recibido azitromicina previamente estaban colonizados al inicio, proporción que aumentó al 100% a los seis meses y que disminuyó al año al 50%, aunque ninguno de ellos desarrolló PcP durante el seguimiento.

Se ha publicado que en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la colonización por *P. jirovecii* puede contribuir a la progresión de la enfermedad y a la inflamación sistémica (Calderón *et al.*, 2007), algo que podría ocurrir también en los pacientes con FQ, por lo que serían necesarios más estudios para evaluar el papel de la colonización por este hongo en el curso y progresión de esta enfermedad.

Nuestros resultados arrojan que de las 15 muestras colonizadas por *P. jirovecii*, cuatro presentaban colonización por *P. aeruginosa* y once estaban libres de esta bacteria. Esto concuerda con un trabajo (Hernández-Hernández *et al.*, 2012) en el que los pacientes con FQ y con *P. jirovecii* eran más propensos a estar libres de *P. aeruginosa*.

5.4. Niveles de betaglucano en pacientes con fibrosis quística.

El 50% de las muestras que procedían de enfermos colonizados presentaron un nivel de betaglucano positivo y de las muestras que estaban libres de colonización, el 75% presentó niveles positivos. El estudio estadístico no demostró diferencias significativas entre ambos grupos y tampoco en función del momento en el que se produjo la colonización.

Estos resultados coinciden con el trabajo de Shimizu *et al.* (2009), que a diferencia del nuestro fue realizado en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, en los que el nivel sérico de betaglucano no fue útil para detectar la colonización por *P. jirovecii*. Sin embargo, el betaglucano sérico y el número de linfocitos fueron útiles para distinguir la colonización por *P. jirovecii* de la PcP en estos pacientes.

5.5. En pacientes trasplantados y sus genotipos.

Todos los pacientes trasplantados estuvieron colonizados en algún momento del seguimiento (excepto uno que no la padeció en ningún momento) a pesar de que todos estaban recibiendo quimioprofilaxis con trimetoprim-sulfametoxazol, fármaco de elección para la profilaxis de infecciones por *P. jirovecii* (Calderón *et al.*, 2010a). Esto podría estar en relación con la posible presencia de mutaciones en el gen de la dihidrofolato sintasa que puede conferir resistencia a las sulfamidas (Matos *et al.*, 2010), de especial relevancia en el caso de desarrollarse una PcP pues podría traducirse en una peor evolución y mayor mortalidad.

Concretamente el paciente que no estuvo colonizado en ningún momento del seguimiento (TP-5) había recibido previamente tratamiento con azitromicina, en concordancia con la efectividad publicada de la azitromicina para la profilaxis de *P. jirovecii* (Dunne *et. al.*, 1999).

La colonización por *P. jirovecii* en los pacientes trasplantados que habían recibido esteroides en los seis meses previos (todos ellos excepto uno en el que lo desconocemos) fue del 40% al inicio, 40% a los seis meses y del 50% al año. Estos resultados son superiores a los del trabajo de Shimizu *et al.* (2009) en el que la prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática que habían recibido esteroides fue del 23,3%, probablemente porque nuestros pacientes reciben además otros inmunosupresores por el trasplante.

Se llevó a cabo el genotipado en diez de las quince muestras colonizadas, siendo el genotipo más frecuentemente encontrado el 3, seguido por el 2 y el 1. En ninguno de los pacientes hemos observado colonización por dos genotipos diferentes y como ya apuntamos anteriormente, se observa un ciclo continuo de colonización y aclaramiento por *P. jirovecii*. Estos resultados en pacientes trasplantados están en consonancia con Montes-Cano *et al.* (2007), quienes estudiaron el esputo de pacientes con FQ en España mediante PCR anidada siendo el genotipo 3 el más frecuente, que parece ser el más adaptado a este tipo de enfermos.

En cambio, Pederiva *et al.* (2012) realizaron PCR anidada del LBA de afectados de FQ en Brasil y encontraron que el genotipo 1 fue el más frecuente y también lo observaron en Francia (Hernández-Hernández *et al.*, 2012).

Las infecciones fúngicas más frecuentes del segundo al sexto mes postrasplante son por *Aspergillus* o *P. jirovecii* (Hirche *et al.*, 2014), por lo que conocer su prevalencia y su dinámica evolutiva resulta de vital importancia en estos pacientes.

De las diez muestras colonizadas por *P. jirovecii* en las que hemos estudiado la presencia bacteriana, encontramos que seis están libres de *P. aeruginosa* y en cuatro está presente. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Hernández-Hernández *et al.* (2012) en el que los pacientes con FQ y con *P. jirovecii* eran más propensos a estar libres de *P. aeruginosa*.

5.6. Niveles de betaglucano en pacientes trasplantados.

El nivel de betaglucano fue negativo sólo en el 27% de las muestras colonizadas y en un 64% de ellas fue positivo para infección fúngica invasiva. En cuanto a las muestras que no estaban colonizadas, en el 33% el nivel de betaglucano fue negativo y en el 42% de ellas el nivel de betaglucano fue positivo para infección fúngica invasiva.

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de betaglucano sérico entre pacientes trasplantados colonizados y no colonizados por *P. jirovecii* y tampoco en función del momento en el que se produjo la colonización.

Tampoco hemos hallado trabajos en la bibliografía revisada que evalúen el papel de la medida del betaglucano sérico para detectar colonización por *P. jirovecii* en pacientes trasplantados de pulmón por FQ.

6. PRINCIPALES AISLAMIENTOS Y NIVELES DE BETAGLUCANO.

6.1. En pacientes con fibrosis quística

Los niveles medios de betaglucano correspondientes a las muestras tanto colonizadas como no colonizadas por *P. jirovecii*, *C. albicans* y *Cándida* no albicans de los pacientes con FQ han sido positivos para infección fúngica invasiva, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas situaciones de colonización por *P. jirovecii*, *C. albicans* y *Cándida* no albicans.

En cuanto a la colonización bacteriana de los pacientes con FQ, los niveles medios de betaglucano correspondientes a las muestras tanto colonizadas como no colonizadas por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* han sido positivos para infección fúngica invasiva, a excepción de la media de betaglucano de las muestras colonizadas por *S. pneumoniae*, que ha arrojado un resultado indeterminado, a pesar de que como ya comentamos anteriormente las infecciones por *S. pneumoniae* son causa de falso positivo (Alexander *et al.*, 2010). Tampoco hemos observado diferencias estadísticamente significativas entre ambas situaciones de colonización por *P. aeruginosa* o *S. pneumoniae*.

No hemos encontrado en la bibliografía revisada trabajos que evalúen el papel de de la medida del betaglucano sérico para la detección de colonización fúngica o bacteriana en pacientes con FQ pero sí se ha investigado en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática en los que el nivel sérico de betaglucano no fue útil para detectar la colonización por *P. jirovecii* (Shimizu *et al.*, 2009).

6.2. En pacientes trasplantados

Los niveles medios de betaglucano correspondientes a las muestras tanto colonizadas como no colonizadas por *P. jirovecii*, *C. albicans* y *Cándida* no albicans de los pacientes trasplantados han resultado positivos o indeterminados para infección fúngica invasiva, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos estados de colonización por *P. jirovecii*, *C. albicans* y *Cándida* no albicans.

En cuanto a la colonización bacteriana en los pacientes trasplantados, los niveles medios de betaglucano correspondientes a las muestras tanto colonizadas como no colonizadas por *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* han sido positivos o indeterminados para infección fúngica invasiva, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos estados de colonización por *P. aeruginosa* o *S. pneumoniae*.

No hemos visto en la bibliografía revisada trabajos que evalúen el papel de de la medida del betaglucano sérico para la detección de colonización fúngica o bacteriana en pacientes sometidos a trasplante de pulmón por FQ.

7. LIMITACIONES

La principal limitación del estudio puede venir derivada del tamaño de la muestra. En este sentido, hay que tener presente que la FQ es una enfermedad considerada rara, y por tanto con una baja prevalencia y que el número de pacientes sometidos a trasplante pulmonar es limitado. Sin embargo, hay que destacar que hemos dispuesto de muestras con un año de seguimiento y aplicado técnicas moleculares de alto rendimiento por lo que consideramos que la información obtenida puede ser relevante.

No hemos sometido a cultivos fúngicos o bacterianos dichas muestras porque adolecen de baja rentabilidad, como ponen de manifiesto trabajos como el de Delhaes *et al.* (2012), sobre muestras de esputo de pacientes adultos con FQ observando que más del 60% de los géneros o especies fúngicas se identificaron por pirosecuenciación y no por cultivo.

Aunque las muestras de lavados orofaríngeos tienen el riesgo de poder sufrir contaminación, las hemos utilizado por ser relativamente fáciles de obtener y es un método no invasivo. Además la cavidad oral es la mayor puerta de entrada para los microorganismos en el cuerpo y el enjuague permite la recogida de los organismos presentes en el dorso de la lengua y en la mucosa oral. Probablemente el LOF tenga un bajo valor predictivo negativo, pues el hecho de que no hallemos un determinado microorganismo en la cavidad orofaríngea no asegura que no esté presente en el tracto respiratorio inferior de estos pacientes, aunque un alto valor predictivo positivo, pues si hallamos un microorganismo patógeno probablemente también esté presente en las vías respiratorias bajas. Además, el LOF probablemente tenga una elevada concordancia con otras muestras respiratorias más difíciles de obtener tales como el esputo o el LBA. En este sentido, Respaldiza *et al.* (2006) analizaron la utilidad del LOF para identificar los portadores de *P. jirovecii* por PCR en este tipo de muestras tomadas en pacientes sin PcP, y encontraron una concordancia del 84,4% con los resultados de las investigaciones del agente en esputos y del 80% en LBA, procedentes de los mismos enfermos.

8. CUESTIONES ABIERTAS

De todo esto entendemos que se derivan una serie de cuestiones para resolver en el futuro:

- ¿Cómo se regulan unos a otros los patógenos de las vías aéreas?.
- ¿Deberían las estrategias antibióticas buscar pulmones estériles o hay microorganismos protectores?.
- ¿Cuál es la contribución patogénica de hongos y virus en el curso longitudinal de la enfermedad pulmonar por FQ?
- ¿Cuál es el riesgo de sufrir infecciones fúngicas invasivas con el uso de corticosteroides? (Calero-Bernal *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con fibrosis quística sometidos a trasplante pulmonar están colonizados por una gran variedad de géneros y especies fúngicas, predominando por su frecuencia *Candida albicans* y *Pneumocystis jirovecii*.
2. La colonización fúngica en pacientes con fibrosis pulmonar sometidos a trasplante pulmonar es un fenómeno dinámico caracterizado por cambios tanto de géneros como de especies identificables a lo largo del tiempo.
3. Los pacientes con fibrosis pulmonar sometidos a trasplante pulmonar presentan, frente a los no trasplantados, una mayor diversidad de géneros y especies fúngicas en su tracto respiratorio así como una mayor frecuencia de colonización por hongos patógenos del género *Aspergillus*.
4. La determinación de los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano no resulta útil como marcador de la colonización fúngica en pacientes con fibrosis quística con y sin trasplante pulmonar.

CONCLUSIONS

1. Lung transplant cystic fibrosis patients suffer from fungal colonization by different genera and species, being *Candida albicans* and *Pneumocystis jirovecii* the most predominant.
2. Fungal colonization in lung transplant cystic fibrosis patients have a dynamic cycle of colonization and clearance of several fungal genera and species.
3. Cystic fibrosis transplant patients present greater diversity of fungal genera and species in the respiratory tract than those non transplanted patients as well as a higher frequency of pathogenic species of genera *Aspergillus*.
4. The determination of (1→3)-β-D-glucan level does not seem to be a useful tool for the detection of fungal colonization in cystic fibrosis patients nor transplant patients.

RESUMEN

RESUMEN

Los pacientes con fibrosis quística constituyen un grupo de riesgo para la colonización por *Pneumocystis jirovecii* y otras especies de hongos y bacterias. Se trata de una enfermedad hereditaria en la que las manifestaciones crónicas broncopulmonares constituyen el problema clínico más frecuente, siendo el trasplante pulmonar la única alternativa final para la mayoría de los casos.

Entre las principales causas de morbimortalidad en los pacientes trasplantados se encuentran las infecciones, destacando las de origen fúngico como la aspergilosis invasiva o la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. Cuando éstos son sometidos a inmunosupresión por el trasplante, son susceptibles de desarrollar infecciones invasivas con elevada mortalidad.

Existen escasos datos sobre la colonización fúngica en afectados por fibrosis quística que han recibido un trasplante pulmonar, por lo que uno de los objetivos de esta tesis es conocer los géneros y especies que se pueden presentar en este grupo de pacientes y su dinámica, así como analizar si existen diferencias con respecto a los afectados por esta enfermedad no trasplantados. Del mismo modo, no se dispone de biomarcadores que permitan identificar estas situaciones, por lo que resulta de gran interés comprobar la utilidad de la determinación de los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano para su detección.

Se han incluido 11 pacientes trasplantados y 13 controles, atendidos en la Unidad de referencia regional en fibrosis quística del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, que han sido seguidos durante un año, con revisiones cada seis meses.

El análisis de las muestras biológicas (lavado orofaríngeo y sangre periférica) se ha realizado en los laboratorios con los que cuenta el grupo de investigación en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) mediante técnicas de biología molecular: PCR anidada para el diagnóstico de la presencia de *P. jirovecii* y su caracterización genotípica por secuenciación directa, técnicas de metagenómica utilizando la amplificación de la región ITS para la determinación de otros hongos, PCR específicas para *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* y cuantificación de los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano mediante el test Fungitell®.

En nuestro trabajo hemos podido observar que en el grupo de sujetos sin enfermedad pulmonar, se identificó en todas las muestras la presencia de hongos que correspondían a hongos ambientales y *Candidas*. Los niveles de betaglucano fueron inferiores a 60 pg/ml en todos los casos y únicamente se correlacionó significativamente con la presencia de *Debaryomyces* ($p= 0,004$). *P. jirovecii* estaba presente en el 33,3% de los sujetos y la media de betaglucano en ellos fue de $8,6 \pm 1,1$ pg/ml y en los que no se detectó este hongo de $13,2 \pm 8,4$ pg/ml, no siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,507$).

La colonización por *S. pneumoniae* estaba presente en la mitad de las muestras estudiadas y en ninguna *P. aeruginosa*. Los niveles medios de betaglucano en los colonizados por *S. pneumoniae* fue de $16,7 \pm 12,6$ pg/ml y en los no hubo ninguna de estas dos especies de $8,6 \pm 1,1$ pg/ml, sin diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,460$).

En el grupo de pacientes con fibrosis quística predominó *Candida* seguida de *Cladosporium*. En cuanto a los niveles de betaglucano, el 57,1% alcanzaron cifras ≥ 80 pg/ml, y el 42,9% restante no llegaron a 60 pg/ml, siendo la media de $118,6 \pm 140,5$ pg/ml. *P. jirovecii* estaba presente al inicio en el 85,7%, a los seis meses en el 100% y al año en el 42,9% y la media de betaglucano en los pacientes portadores de este hongo fue de $110,6 \pm 157,5$ pg/ml y en los otros de $138,5 \pm 101,7$ pg/ml, sin significación estadística ($p= 0,752$).

En el estudio bacteriológico, se encontraron siete muestras colonizadas por *P. aeruginosa* y en tres de ellas además *S. pneumoniae*. Los niveles de betaglucano correspondientes a las muestras en las que se aísla un género bacteriano fue de $169,3 \pm 78,9$ pg/ml y en las que se hallaron ambos, de $65,3 \pm 39,9$ pg/ml, sin existir diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,095$).

En el grupo de pacientes trasplantados, *Candida* fue el género más frecuentemente encontrado. En el 43,5% de las muestras estudiadas se aisló un solo género y en el 56,5% restante se identificaron dos o más. El 56,5% del total arrojaron cifras de betaglucano superiores a 80 pg/ml, el 17,4% se encontraron entre 60-79 pg/ml y el 26,1% inferiores a 60 pg/ml. La cantidad media de betaglucano en las muestras que estaban colonizadas por *Candida* fue de $83,1 \pm 37,2$ pg/ml y en las que no lo

estaban por dicho microorganismo de $85,2 \pm 19,4$ pg/ml, sin diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,896$). La colonización por *P. jirovecii* fue de 45,5% al inicio, 36,4% a los seis meses y 54,5% al año, siendo el genotipo 3 el más frecuente. En ningún caso se detectó la coexistencia de varios genotipos. En los pacientes con presencia de dicho agente la media de betaglucano fue $87,6 \pm 37,7$ pg/ml y en los que no se detectó de $73,6 \pm 35,7$ pg/ml, sin diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,371$).

En cuanto a la colonización bacteriana, en nueve del total de las muestras se halló *P. aeruginosa* (recogidas en siete de los once pacientes) y en doce *S. pneumoniae* (tomadas en ocho de los once enfermos). En el conjunto de los enfermos el nivel medio de betaglucano fue de $79,7 \pm 27,7$ pg/ml, en los que se aisló uno de los dos géneros fue de $81,9 \pm 26,7$ pg/ml y en los que se identificaron ambos fue de $82,3 \pm 26,6$ pg/ml. En los individuos no colonizados fue de $74,6 \pm 33$ pg/ml, sin diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,852$).

Podemos concluir que los pacientes con fibrosis quística sometidos a trasplante pulmonar presentan colonización fúngica, por distintos géneros y especies, con una tendencia al predominio de *Candida* y *Pneumocystis*. Asimismo, éstos sufren una dinámica continua de colonización y aclaramiento tanto de *P. jirovecii* como de otros hongos, observando un incremento del número de taxones presentes a lo largo del tiempo. En cuanto a los enfermos con fibrosis quística, la presencia fúngica aumenta con el tiempo. Por último, la determinación de los niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano no resulta útil como marcador de colonización fúngica ni en pacientes con fibrosis quística ni en trasplantados de pulmón.

SUMMARY

Patients suffering from cystic fibrosis are a group of risk for *Pneumocystis jirovecii* and other fungal and bacterial species colonization. This is a hereditary disease in which chronic pulmonary manifestations are the main clinical problem, and actually lung transplantation is the best treatment for those patients.

Infections are the main causes of morbidity and mortality in transplanted patients, mainly fungal infections as invasive aspergilosis or *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. When these patients receive immunosuppressive therapy are in special risk for invasive fungal infections with high mortality rate.

There are only a few studies about fungal colonization in cystic fibrosis patients suffering from lung transplantation, therefore one of the objective of present Thesis aims to describe the fungal genera and species that may colonize this group of patients and their dynamic, and also, to analyze if there are any difference with cystic fibrosis patients. In the same way, there are no identified biomarkers for these situations, so that it would be especially useful if we could use the (1→3)-β-D-glucans as an aid to identify colonization in those patients.

Eleven transplant patients and 13 controls from Cystic Fibrosis Regional Reference Unit at Virgen del Rocío University Hospital have been included in the study. They have been followed along a year with revision visits every six months.

The analysis of the samples (oropharyngeal washes and peripheral blood) has been carried out at the Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) laboratory using molecular techniques: nested PCR for *P. jirovecii* and direct sequencing for genotypic characterization, metagenomic approach based on fungal ITS region, specific PCR for *P. aeruginosa* and *S. pneumoniae* and the levels of (1→3)-β-D-glucans by the test Fungitell®.

In present study, individuals without lung disease were colonized mainly by common indoor and outdoor molds and *Candida* sp. Betaglucan was inferior to 60 pg/ml in all cases and *Debaryomyces* was the only one statistically significant ($p=0.004$). *P. jirovecii* was present in the 33.3% of the cases. The average betaglucan level in the patients with this microorganism was 8.6 ± 1.1 pg/ml and in the

patients without colonization was 13.2 ± 8.4 pg/ml, without statistically significant difference ($p= 0.507$).

S. pneumoniae was present in half of the studied samples and *P. aeruginosa* in none of them. The average betaglucan level was 16.7 ± 12.6 pg/ml in the group of colonized patients, and 8.6 ± 1.1 pg/ml in the uncolonized patients, without statistically significant difference ($p= 0.460$).

In the cystic fibrosis group, *Candida* was the most frequent fungus followed by *Cladosporium*. The betaglucan levels were ≥ 80 pg/ml in the 57.1% of the samples and inferior to 60 pg/ml in the remaining 42.9%, being the average betaglucan level 118.6 ± 140.5 pg/ml. *P. jirovecii* was present in the 85.7% of the cases at the initiation of the study, 100% at six months and 42.9% at one year follow-up. The average betaglucan level was 110.6 ± 157.5 pg/ml in the colonization group and 138.5 ± 101.7 pg/ml in the uncolonization group, without statistically significant difference ($p= 0,752$).

In the bacteriological study, seven samples were colonized by *P. aeruginosa* and also *S. pneumoniae* in three of them. The average betaglucan level was 169.3 ± 78.9 pg/ml in the samples with one bacterial genera and 65.3 ± 39.9 pg/ml in the ones with both genera, without statistical significance ($p= 0.095$).

In the transplant patients group, *Candida* was the most predominant fungus. One genera was present in the 43.5% of the samples and two or more were present in the other 56.5%. The betaglucan level was superior to 80 pg/ml in the 56.5% of the cases, between 60-79 pg/ml in the 17.4% and inferior to 60 pg/ml in the 26.1%. The average betaglucan level of *Candida* colonized samples was 83.1 ± 37.2 pg/ml and 85.2 ± 19.4 pg/ml in the uncolonized samples, without statistically significant difference ($p= 0.896$). Frequency of *P. jirovecii* colonization was 45.5% at the initiation, 36.4% at six months and 54.5% at one year follow-up, being genotype 3 the most common. In any case we found more than one genotype. The average betaglucan level was 87.6 ± 37.7 pg/ml in colonized patients and 73.6 ± 35.7 pg/ml in the uncolonized group, without statistical significance ($p= 0.371$).

In the bacteriological study, *P. aeruginosa* was present in nine samples (collected in seven out of eleven patients) and *S. pneumoniae* in twelve (from eight out of eleven patients). The average betaglucan level was 79.7 ± 27.7 pg/ml in the total of samples, 81.9 ± 26.7 pg/ml in the samples with one genera and 82.3 ± 26.6 pg/ml in the samples with both genera. The betaglucan level in uncolonized patients was 74.6 ± 33 pg/ml without statistical significance ($p= 0.852$).

We can conclude that lung transplant cystic fibrosis patients suffer fungal colonization by different genera and species, being *Candida* sp. and *Pneumocystis jirovecii* the most predominant. Further, these patients have a continuous colonization and clearance dynamic cycle of *P. jirovecii* and other fungi, showing an increasing number of taxa over the follow-up time. The fungal colonization in cystic fibrosis patients grow over time. Finally, the determination of (1→3)-β-D-glucan level do not seem to be a useful tool for the detection of fungal colonization in cystic fibrosis patients nor trasplant patients.

BILIOGRAFÍA

BILIOGRAFÍA

- Alexander, B. D., Smith, P. B., Davis, R. D., Perfect, J. R., & Reller, L. B. (2010). The (1,3)-D-glucan test as an aid to early diagnosis of invasive fungal infections following lung transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(11), 4083-4088.
- Alvarez, S., Herrero, C., Bru, E., & Perdigon, G. (2001). Effect of *Lactobacillus casei* and yogurt administration on prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in young mice. *Journal of Food Protection*, *64*(11), 1768-1774.
- Amaral, M. D. (2015). Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *Journal of Internal Medicine*, *277*(2), 155-166.
- Amin, R., Dupuis, A., Aaron, S. D., & Ratjen, F. (2010). The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*, *137*(1), 171-176.
- Anzaudo, M. M., Busquets, N. P., Ronchi, S., & Mayoral, C. (2005). [Isolated pathogen microorganisms in respiratory samples from children with cystic fibrosis]. *Revista Argentina De Microbiología*, *37*(3), 129-134.
- Assael, B. M., Pressler, T., Bilton, D., Fayon, M., Fischer, R., Chiron, R., AZLI Active Comparator Study Group. (2013). Inhaled aztreonam lysine vs. inhaled tobramycin in cystic fibrosis: a comparative efficacy trial. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, *12*(2), 130-140.
- Barker, B. M., Kroll, K., Vödisch, M., Mazurie, A., Kniemeyer, O., & Cramer, R. A. (2012). Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. *BMC Genomics*, *13*, 62.
- Baxter, C. G., Dunn, G., Jones, A. M., Webb, K., Gore, R., Richardson, M. D., & Denning, D. W. (2013a). Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(3), 560-566.e10.
- Baxter, C. G., Moore, C. B., Jones, A. M., Webb, A. K., & Denning, D. W. (2013b). IgE-mediated immune responses and airway detection of *Aspergillus* and *Candida* in adult cystic fibrosis. *Chest*, *143*(5), 1351-1357.
- Bellanger, A.-P., Millon, L., Rognon, B., Roussel, S., Botterel, F., Bretagne, S., & Reboux, G. (2011). Variable beta-glucans production by different states of *Eurotium amstelodami* explains differences in inflammatory responses in airway cells. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, *119*(9), 605-610.
- Berge, M., Guillemain, R., Boussaud, V., Pham, M.-H., Chevalier, P., Batische, A., Billaud, E. M. (2009). Voriconazole pharmacokinetic variability in cystic fibrosis lung transplant patients. *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, *11*(3), 211-219.
- Berk, D. R., Lu, D., & Bayliss, S. J. (2013). Trichodysplasia spinulosa in an adolescent with cystic fibrosis and lung transplantation. *International Journal of Dermatology*, *52*(12), 1586-1588.
- Bertani, A., Grossi, P., Vitulo, P., D'Ancona, G., Arcadipane, A., Nanni Costa, A., & Gridelli, B. (2009). Successful lung transplantation in an HIV- and HBV-positive patient with cystic fibrosis. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *9*(9), 2190-2196.
- Bille, J., Marchetti, O., & Calandra, T. (2005). Changing face of health-care associated fungal infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *18*(4), 314-319.
- Bilton, D., Robinson, P., Cooper, P., Gallagher, C. G., Kolbe, J., Fox, H., CF301 Study Investigators. (2011). Inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an efficacy and safety study. *The European Respiratory Journal*, *38*(5), 1071-1080.
- Bittar, F., Richet, H., Dubus, J.-C., Reynaud-Gaubert, M., Stremmer, N., Sarles, J., Rolain, J.-M. (2008). Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PloS One*, *3*(8), e2908.
- Blohmke, C. J., Park, J., Hirschfeld, A. F., Victor, R. E., Schneiderman, J., Stefanowicz, D., ... Turvey, S. E. (2010). TLR5 as an anti-inflammatory target and modifier gene in cystic fibrosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *185*(12), 7731-7738.
- Blyth, C. C., Middleton, P. G., Harun, A., Sorrell, T. C., Meyer, W., & Chen, S. C.-A. (2010). Clinical associations and prevalence of *Scenedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Medical Mycology*, *48 Suppl 1*, S37-44.

- Boasquevisque, C. H. R., Yildirim, E., Waddel, T. K., & Keshavjee, S. (2009). Surgical techniques: lung transplant and lung volume reduction. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(1), 66-78.
- Bobadilla, J. L., Macek, M., Fine, J. P., & Farrell, P. M. (2002). Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation*, 19(6), 575-606.
- Bonvillain, R. W., Valentine, V. G., Lombard, G., LaPlace, S., Dhillon, G., & Wang, G. (2007). Post-operative Infections in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Patients After Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 26(9), 890-897.
- Boon, C., Deng, Y., Wang, L.-H., He, Y., Xu, J.-L., Fan, Y., Zhang, L.-H. (2008). A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. *The ISME Journal*, 2(1), 27-36.
- Borekci S, Halis AN, Aygun G, Musellim B (2016). Bacterial colonization and associated factors in patients with bronchiectasis. *Annals Thoracic Medicine*, 11 (1), 55-9.
- Bresci, S., Borchi, B., Ambu, S., Taccetti, G., Braggion, C., & Leoncini, F. (2010). Case Report: Cystic Fibrosis, Lung Transplantation, and the Novel H1N1 Flu. *Transplantation Proceedings*, 42(6), 2270-2273.
- Brizendine, K. D., Baddley, J. W., Pappas, P. G., Leon, K. J., & Rodriguez, J. M. (2012). Fatal *Burkholderia gladioli* infection misidentified as *Empedobacter brevis* in a lung transplant recipient with cystic fibrosis. *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, 14(4), E13-18.
- Brown, P. S., Pope, C. E., Marsh, R. L., Qin, X., McNamara, S., Gibson, R., Hoffman, L. R. (2014). Directly sampling the lung of a young child with cystic fibrosis reveals diverse microbiota. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(7), 1049-1055.
- Bugano, D. D. G., Campos, S. V., Afonso Jr, J. E., Caramori, M. L., Teixeira, R. H. O. B., Carraro, R. M., Jatene, F. B. (2010). Impact of Cytomegalovirus Infection in Lung Transplant Patients Under Universal Prophylaxis: Single-Center Experience in Brazil. *Transplantation Proceedings*, 42(2), 525-530.
- Burns, J. L., Emerson, J., Stapp, J. R., Yim, D. L., Krzewinski, J., Loudon, L., Clausen, C. R. (1998). Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27(1), 158-163.
- Calderón, E. J. (2010). Pneumocystis infection: seeing beyond the tip of the iceberg. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(3), 354-356.
- Calderón, E. J., Friaza, V., Dapena, F. J., & de La Horra, C. (2010b). Pneumocystis jirovecii and cystic fibrosis. *Medical Mycology*, 48 Suppl 1, S17-21.
- Calderón, E. J., Gutiérrez-Rivero, S., Durand-Joly, I., & Dei-Cas, E. (2010a). Pneumocystis infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(6), 683-701.
- Calderón, E.J., Rivero, L., Respaldiza, N., Morilla, R., Montes-Cano, M.A., Friaza, V., Muñoz-Lobato, F., Varela, J.M., Medrano, F.J., Horra, C. de L. (2007). Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clinical Infectious Diseases*, 45:e17-e19.
- Calero-Bernal, M.L., Martin-Garrido, I., Donazar-Ezcurra, M., Limper, A.H., Carmona, E.M. (2016). Intermittent courses of corticosteroids also present a risk for *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV patients. *Canadian Respiratory Journal*, 2016, Article ID 2464791, 7 pages.
- Chalmers, J. D., Fleming, G. B., Hill, A. T., & Kilpatrick, D. C. (2011). Impact of mannose-binding lectin insufficiency on the course of cystic fibrosis: A review and meta-analysis. *Glycobiology*, 21(3), 271-282.
- Chaparro, C., Maurer, J., Gutierrez, C., Krajden, M., Chan, C., Winton, T., ... Kesten, S. (2001). Infection with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: outcome following lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(1), 43-48.
- Chen, J.-H., Stoltz, D. A., Karp, P. H., Ernst, S. E., Pezzulo, A. A., Moninger, T. O., Welsh, M. J. (2010). Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. *Cell*, 143(6), 911-923.
- Chmiel, J. F., Aksamit, T. R., Chotirmall, S. H., Dasenbrook, E. C., Elborn, J. S., LiPuma, J. J., ... Ratjen, F. A. (2014). Antibiotic management of lung infections in cystic fibrosis. II. Nontuberculous mycobacteria, anaerobic bacteria, and fungi. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(8), 1298-1306.

- Chrenkova, V., Kolarik, M., Hubacek, P., Kolarik, J., Simonek, J., Lischke, R., & Drevinek, P. (2015). Possible *Tyromyces fissilis* (Basidiomycota, Polyporales) co-infection in a lung transplant recipient. *Folia Microbiologica*, *60*(1), 33-35.
- Christie, J. D., Edwards, L. B., Kucheryavaya, A. Y., Benden, C., Dipchand, A. I., Dobbels, F., International Society of Heart and Lung Transplantation. (2012). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*, *31*(10), 1073-1086.
- Chryssanthou, E., Klingspor, L., Tollemar, J., Petrini, B., Larsson, L., Christensson, B., & Ringdén, O. (1999). PCR and other non-culture methods for diagnosis of invasive *Candida* infections in allogeneic bone marrow and solid organ transplant recipients. *Mycoses*, *42*(4), 239-247.
- Ciofu, O., Johansen, H. K., Aanaes, K., Wassermann, T., Alhede, M., von Buchwald, C., & Høiby, N. (2013). *P. aeruginosa* in the paranasal sinuses and transplanted lungs have similar adaptive mutations as isolates from chronically infected CF lungs. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, *12*(6), 729-736.
- Clancy, J. P., Dupont, L., Konstan, M. W., Billings, J., Fustik, S., Goss, C. H., Arikace Study Group. (2013). Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Thorax*, *68*(9), 818-825.
- Clancy, J. P., Rowe, S. M., Accurso, F. J., Aitken, M. L., Amin, R. S., Ashlock, M. A., Konstan, M. W. (2012). Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*, *67*(1), 12-18.
- Corvol, H., Blackman, S. M., Boëlle, P.Y., Gallins, P.J., Pace, R.G., Stonebracker, J. R., Accurso, F. J. (2015). Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nature Communications*, *6*:8382.
- Cox, M. J., Allgaier, M., Taylor, B., Baek, M. S., Huang, Y. J., Daly, R. A., Lynch, S. V. (2010). Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One*, *5*(6), e11044.
- Danziger-Isakov, L. A., Worley, S., Arrigain, S., Aurora, P., Ballmann, M., Boyer, D., Faro, A. (2008). Increased Mortality After Pulmonary Fungal Infection Within the First Year After Pediatric Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, *27*(6), 655-661.
- Davies, J. C., Ebdon, A.-M., & Orchard, C. (2014). Recent advances in the management of cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood*, *99*(11), 1033-1036.
- Davis, C. S., Deburghraeve, C. R., Yong, S., Parada, J. P., Palladino-Davis, A. G., Lowery, E., Fisichella, P. M. (2010). Challenges in the Diagnosis of 2009 H1N1 in a Lung Transplant Patient and the Long-Term Implications for Prevention and Treatment: A Case Report. *Transplantation Proceedings*, *42*(10), 4295-4299.
- Davis, P. B., Drumm, M., & Konstan, M. W. (1996). Cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *154*(5), 1229-1256.
- de Pablo, A., Juarros, L., Jodra, S., Pérez, V., López, E., González, O., Lung Transplantation Unit. (2013). Analysis of patients referred to a lung transplantation unit. *Transplantation Proceedings*, *45*(6), 2351-2356.
- Dei-Cas, E. (2000). Pneumocystis infections: the iceberg? *Medical Mycology*, *38 Suppl 1*, 23-32.
- Delhaes, L., Monchy, S., Fréalle, E., Hubans, C., Salleron, J., Leroy, S., Viscogliosi, E. (2012). The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community-implications for therapeutic management. *PLoS One*, *7*(4), e36313.
- Deschaght, P., De Baere, T., Van Simaey, L., Van Daele, S., De Baets, F., De Vos, D., Vanechoutte, M. (2009). Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *BMC Microbiology*, *9*, 244.
- Dodge, J. A. (2015). A millennial view of cystic fibrosis. *Developmental Period Medicine*, *19*(1), 9-13.
- Drumm, M. L., Konstan, M. W., Schluchter, M. D., Handler, A., Pace, R., Zou, F., Gene Modifier Study Group. (2005). Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, *353*(14), 1443-1453.
- Dumitru, R., Navarathna, D. H. M. L. P., Semighini, C. P., Elowsky, C. G., Dumitru, R. V., Dignard, D., Nickerson, K. W. (2007). In vivo and in vitro anaerobic mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, *6*(3), 465-472.

- Dunne, M.W., Bozzette, S., McCutchan, J.A. (1999). Efficacy of azithromycin in prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia: a randomised trial. California collaborative trust Group. *Lancet*, 354: 891-895.
- Durand-Joly, I., Chabé, M., Soula, F., Delhaes, L., Camus, D., & Dei-Cas, E. (2005). Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45(3), 405-410.
- Edman, J. C., Kovacs, J. A., Masur, H., Santi, D. V., Elwood, H. J., & Sogin, M. L. (1988). Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334(6182), 519-522.
- Elborn, J. S. (2006). Practical Management of Cystic Fibrosis. *Chronic Respiratory Disease*, 3(3), 161-165.
- Elborn, J. S., Bell, S. C., Madge, S. L., Burgel, P.-R., Castellani, C., Conway, S., Blasi, F. (2016). Report of the European Respiratory Society/European Cystic Fibrosis Society task force on the care of adults with cystic fibrosis. *The European Respiratory Journal*, 47(2), 420-428.
- Elkins, M. R., Robinson, M., Rose, B. R., Harbour, C., Moriarty, C. P., Marks, G. B., National Hypertonic Saline in Cystic Fibrosis (NHSCF) Study Group. (2006). A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 354(3), 229-240.
- Elphick, H. E., & Southern, K. W. (2014). Antifungal therapies for allergic bronchopulmonary aspergillosis in people with cystic fibrosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, CD002204.
- Elvin, K. M., Björkman, A., Linder, E., Heurlin, N., & Hjerpe, A. (1988). *Pneumocystis carinii* pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage fluid by monoclonal antibodies. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 297(6645), 381-384.
- Esposito, S., Daccò, V., Daleno, C., Gambazza, S., Montinaro, V., Bisogno, A., Colombo, C. (2014). Human rhinovirus infection in children with cystic fibrosis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 67(5), 399-401.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1:329-37.
- Farrell, P. M. (2008). The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(5), 450-453.
- Field, A. s., Paik, J. y., Stark, D., Qiu, M. r., Morey, A., Plit, M. l., Glanville, A. r. (2012). Myositis due to the microsporidian *Anncaliia (Brachiola) algerae* in a lung transplant recipient. *Transplant Infectious Disease*, 14(2), 169-176.
- Fillaux, J., Brémont, F., Murriss, M., Cassaing, S., Tétu, L., Segonds, C., Magnaval, J.-F. (2014). *Aspergillus* sensitization or carriage in cystic fibrosis patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 33(7), 680-686.
- Finlen Copeland, C. A., Davis, W. A., Snyder, L. D., Banks, M., Avery, R., Davis, R. D., & Palmer, S. M. (2011). Long-term efficacy and safety of 12 months of valganciclovir prophylaxis compared with 3 months after lung transplantation: A single-center, long-term follow-up analysis from a randomized, controlled cytomegalovirus prevention trial. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30(9), 990-996.
- Fischer, J., van Koningsbruggen-Rietschel, S., Rietschel, E., Vehreschild, M. J. G. T., Wisplinghoff, H., Krönke, M., & Hamprecht, A. (2014). Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. isolates from German cystic fibrosis patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(6), 1533-1536.
- Gal, S. L., Héry-Arnaud, G., Ramel, S., Virmaux, M., Damiani, C., Totet, A., & Nevez, G. (2010). *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42(3), 225-227.
- García-Morillo, S. (2006). Cartas al editor. *Medicina Clínica*, 127(16), 637-639.
- Garland, A. L., Walton, W. G., Coakley, R. D., Tan, C. D., Gilmore, R. C., Hobbs, C. A., Tarran, R. (2013). Molecular basis for pH-dependent mucosal dehydration in cystic fibrosis airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), 15973-15978.
- Geller, D. E., Nasr, S. Z., Piggott, S., He, E., Angyalosi, G., & Higgins, M. (2014). Tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis patients: response by age group. *Respiratory Care*, 59(3), 388-398.
- Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000713.

- Gilligan, P. H. (2014). Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clinics in Laboratory Medicine*, 34(2), 197-217.
- Griesenbach, U., Inoue, M., Meng, C., Farley, R., Chan, M., Newman, N. K., Alton, E. W. F. W. (2012). Assessment of F/HN-pseudotyped lentivirus as a clinically relevant vector for lung gene therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(9), 846-856.
- Guss, A. M., Roeselers, G., Newton, I. L. G., Young, C. R., Klepac-Ceraj, V., Lory, S., & Cavanaugh, C. M. (2011). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *The ISME Journal*, 5(1), 20-29.
- Harness-Brumley, C. L., Elliott, A. C., Rosenbluth, D. B., Raghavan, D., & Jain, R. (2014). Gender differences in outcomes of patients with cystic fibrosis. *Journal of Women's Health* (2002), 23(12), 1012-1020.
- Harris, J. K., De Groote, M. A., Sagel, S. D., Zemanick, E. T., Kapsner, R., Penvari, C., Pace, N. R. (2007). Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20529-20533.
- Harrison, F. (2007). Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 4), 917-923.
- Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M., & McColley, S. A. (2011). Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 29-70.
- Hayes, D., Kirkby, S., Whitson, B. A., Black, S. M., Sheikh, S. I., Tobias, J. D. Kopp, B. T. (2015). Mortality Risk and Pulmonary Function in Adults With Cystic Fibrosis at Time of Wait Listing for Lung Transplantation. *The Annals of Thoracic Surgery*, 100(2), 474-479.
- Hayes, D., Mansour, H. M., Kirkby, S., & Phillips, A. B. (2012). Rapid acute onset of bronchiolitis obliterans syndrome in a lung transplant recipient after respiratory syncytial virus infection. *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, 14(5), 548-550.
- Helmi, M., Love, R. B., Welter, D., Cornwell, R. D., & Meyer, K. C. (2003). Aspergillus infection in lung transplant recipients with cystic fibrosis: risk factors and outcomes comparison to other types of transplant recipients. *Chest*, 123(3), 800-808.
- Hernández-Hernández, F., Fréalles, E., Caneiro, P., Salleron, J., Durand-Joly, I., Accoceberry, I., Delhaes, L. (2012). Prospective multicenter study of Pneumocystis jirovecii colonization among cystic fibrosis patients in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4107-4110.
- Hinson, K. F. W., Moon, A. J., & Plummer, N. S. (1952). Broncho-pulmonary aspergillosis; a review and a report of eight new cases. *Thorax*, 7(4), 317-333.
- Hirche, T. O., Knoop, C., Hebestreit, H., Shimmin, D., Solé, A., Elborn, J. S., ECORN-CF Study Group. (2014). Practical guidelines: lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *Pulmonary Medicine*, 2014, 621342.
- Hirschi, S., Letscher-Bru, V., Pottecher, J., Lannes, B., Jeung, M. Y., Degot, T., Kessler, R. (2012). Disseminated Trichosporon mycotoxinivorans, Aspergillus fumigatus, and Scedosporium apiospermum coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4168-4170.
- Hogan, D. A., & Kolter, R. (2002). Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5576), 2229-2232.
- Hohl, T. M., Van Epps, H. L., Rivera, A., Morgan, L. A., Chen, P. L., Feldmesser, M., & Pamer, E. G. (2005). Aspergillus fumigatus triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathogens*, 1(3), e30.
- Hoiby, N. (1974). Epidemiological investigations of the respiratory tract bacteriology in patients with cystic fibrosis. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and Immunology*, 82(4), 541-550.
- Hoo, A.-F., Thia, L. P., Nguyen, T. T. D., Bush, A., Chudleigh, J., Lum, S., London Cystic Fibrosis Collaboration. (2012). Lung function is abnormal in 3-month-old infants with cystic fibrosis diagnosed by newborn screening. *Thorax*, 67(10), 874-881.
- Hosseini-Moghaddam, S. M., & Husain, S. (2010). Fungi and molds following lung transplantation. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 31(2), 222-233.
- Hot, A., Maunoury, C., Poiree, S., Lanternier, F., Viard, J. P., Loulergue, P., Lortholary, O. (2011). Diagnostic contribution of positron emission tomography with [18F]fluorodeoxyglucose for invasive fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), 409-417.

- Illek, B., Zhang, L., Lewis, N. C., Moss, R. B., Dong, J. Y., & Fischer, H. (1999). Defective function of the cystic fibrosis-causing missense mutation G551D is recovered by genistein. *The American Journal of Physiology*, 277(4 Pt 1), C833-839.
- Iversen, M., Burton, C. M., Vand, S., Skovfoged, L., Carlsen, J., Milman, N., Tvede, M. (2007). Aspergillus infection in lung transplant patients: incidence and prognosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(12), 879-886.
- Jaksch, P., Wiedemann, D., Augustin, V., Muraközy, G., Scheed, A., Kocher, A. A., & Klepetko, W. (2013). Antithymocyte globulin induction therapy improves survival in lung transplantation for cystic fibrosis. *Transplant International*, 26(1), 34-41.
- Jordan, P. W., Stanley, T., Donnelly, F. M., Elborn, J. S., McClurg, R. B., Millar, B. C., Moore, J. E. (2007). Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. *Letters in Applied Microbiology*, 44(5), 459-466.
- Kamath, K. S., Kumar, S. S., Kaur, J., Venkatakrishnan, V., Paulsen, I. T., Nevalainen, H., & Molloy, M. P. (2015). Proteomics of hosts and pathogens in cystic fibrosis. *Proteomics. Clinical Applications*, 9(1-2), 134-146.
- Kanj, S. S., Tapson, V., Davis, R. D., Madden, J., & Browning, I. (1997). Infections in patients with cystic fibrosis following lung transplantation. *Chest*, 112(4), 924-930.
- Kerem, E., Konstan, M. W., De Boeck, K., Accurso, F. J., Sermet-Gaudelus, I., Wilschanski, M., Cystic Fibrosis Ataluren Study Group. (2014). Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 2(7), 539-547.
- Khan, S. U., Gordon, S. M., Stillwell, P. C., Kirby, T. J., & Arroliga, A. C. (1996). Empyema and bloodstream infection caused by Burkholderia gladioli in a patient with cystic fibrosis after lung transplantation. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 15(7), 637-639.
- Khare, R., Gupta, S., Arif, S., Jentoft, M. E., Deziel, P. J., Roden, A. C., Wengenack, N. L. (2014). Misidentification of Neosartorya pseudofischeri as Aspergillus fumigatus in a lung transplant patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2722-2725.
- Klekotka RB, Mizgała E, Król W. (2015). The etiology of lower respiratory tract infections in people with diabetes. *Pneumonologia I Alergologia Polska*, 83(5), 401-8
- Klepac-Ceraj, V., Lemon, K. P., Martin, T. R., Allgaier, M., Kembel, S. W., Knapp, A. A., Kolter, R. (2010). Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and Pseudomonas aeruginosa. *Environmental Microbiology*, 12(5), 1293-1303.
- Kopp, B. T., Nicholson, L., Paul, G., Tobias, J., Ramanathan, C., & Hayes, D. (2015). Geographic variations in cystic fibrosis: An analysis of the U.S. CF Foundation Registry. *Pediatric Pulmonology*, 50(8), 754-762.
- Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Asberg, A., Chou, S., Snyderman, D. R., Transplantation Society International CMV Consensus Group. (2010). International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*, 89(7), 779-795.
- Kumar, S., Tana, A., & Shankar, A. (2014). Cystic fibrosis--what are the prospects for a cure? *European Journal of Internal Medicine*, 25(9), 803-807.
- Kunzelmann, K., Tian, Y., Martins, J. R., Faria, D., Kongsuphol, P., Ousingsawat, J., Schreiber, R. (2011). Anoctamins. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 462(2), 195-208.
- Lahiri, T., Guillet, A., Diehl, S., & Ferguson, M. (2014). High-dose ibuprofen is not associated with increased biomarkers of kidney injury in patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*, 49(2), 148-153.
- Lázaro, M., Ramos, A., Ussetti, P., Asensio, A., Laporta, R., Muñoz, E., Varela, A. (2011). Aspergillus endocarditis in lung transplant recipients: case report and literature review. *Transplant Infectious Disease*, 13(2), 186-191.
- Lebecque, P., Leonard, A., Huang, D., Reyhler, G., Boeras, A., Leal, T., & Symoens, F. (2010). Exophiala (Wangiella) dermatitidis and cystic fibrosis - Prevalence and risk factors. *Medical Mycology*, 48 Suppl 1, S4-9.
- Lee, J. T., Kelly, R. F., Hertz, M. I., Dunitz, J. M., & Shumway, S. J. (2013). Clostridium difficile infection increases mortality risk in lung transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*, 32(10), 1020-1026.
- Lefeuvre, S., Chevalier, P., Charpentier, C., Zekkour, R., Havard, L., Benammar, M., Billaud, E. m. (2010). Valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus infection in thoracic transplant

- patients: retrospective study of efficacy, safety, and drug exposure. *Transplant Infectious Disease*, 12(3), 213-219.
- Lipuma, J. J. (2010). The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 299-323.
- Liu, M., Worley, S., Arrigain, S., Aurora, P., Ballmann, M., Boyer, D., Danziger-Isakov, L. a. (2009b). Respiratory viral infections within one year after pediatric lung transplant. *Transplant Infectious Disease*, 11(4), 304-312.
- Liu, M., Worley, S., Mallory Jr., G. B., Arrigain, S., Robertson, J., Schecter, M. G., Danziger-Isakov, L. A. (2009a). Fungal Infections in Pediatric Lung Transplant Recipients: Colonization and Invasive Disease. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 28(11), 1226-1230.
- Lobo, L. J., Chang, L. C., Esther, C. R., Gilligan, P. H., Tulu, Z., & Noone, P. G. (2013). Lung transplant outcomes in cystic fibrosis patients with pre-operative Mycobacterium abscessus respiratory infections. *Clinical Transplantation*, 27(4), 523-529.
- López-Causapé, C., Rojo-Moliner, E., Macià, M. D., & Oliver, A. (2015). The problems of antibiotic resistance in cystic fibrosis and solutions. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 9(1), 73-88.
- Lorè, N. I., Cigana, C., De Fino, I., Riva, C., Juhas, M., Schwager, S., Bragonzi, A. (2012). Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts. *PLoS One*, 7(4), e35648.
- Luong, M.-L., Chaparro, C., Stephenson, A., Rotstein, C., Singer, L. G., Waters, V., Husain, S. (2014). Pretransplant *Aspergillus* colonization of cystic fibrosis patients and the incidence of post-lung transplant invasive aspergillosis. *Transplantation*, 97(3), 351-357.
- Mahenthalingam, E. (2014). Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. *Paediatric Respiratory Reviews*, 15 Suppl 1, 13-15.
- Mahenthalingam, E., Campbell, M. E., & Speert, D. P. (1994). Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infection and Immunity*, 62(2), 596-605.
- Matos, O., Costa, M. C., Lundgren, B., Caldeira, L., Aguiar, P., & Antunes, F. (2001). Effect of oral washes on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia with a low parasite burden and on detection of organisms in subclinical infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 20(8), 573-575.
- Matos, O., Esteves, F. (2010). Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite*, 17(3):219-32.
- Mattner, F., Fischer, S., Weissbrodt, H., Chaberny, I. F., Sohr, D., Gottlieb, J., Strueber, M. (2007). Post-operative Nosocomial Infections After Lung and Heart Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 26(3), 241-249.
- Mayer-Hamblett, N., Rosenfeld, M., Emerson, J., Goss, C. H., & Aitken, M. L. (2002). Developing cystic fibrosis lung transplant referral criteria using predictors of 2-year mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(12 Pt 1), 1550-1555.
- Mayeur, N., Srairi, M., Tetu, L., Guilbeau Frugier, C., Fourcade, O., & Dahan, M. (2012). Lethal hemorrhagic alveolitis after adenovirus pneumonia in a lung transplant recipient. *Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care*, 41(4), 401-403.
- McCormick, J., Mehta, G., Olesen, H. V., Viviani, L., Macek, M., Mehta, A., & European Registry Working Group. (2010). Comparative demographics of the European cystic fibrosis population: a cross-sectional database analysis. *Lancet (London, England)*, 375(9719), 1007-1013.
- Mennink-Kersten, M. A. S. H., Ruegebrink, D., & Verweij, P. E. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(12), 1930-1931.
- Miceli, M. H., Díaz, J. A., & Lee, S. A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(2), 142-151.
- Middleton, P. G., Chen, S. C.-A., & Meyer, W. (2013). Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 19(6), 670-675.
- Millar, F. A., Simmonds, N. J., & Hodson, M. E. (2009). Trends in pathogens colonising the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis, 1985-2005. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 8(6), 386-391.
- Miossec, C., Morio, F., Lepoivre, T., Pape, P. L., Garcia-Hermoso, D., Gay-Andrieu, F., Miegéville, M. (2011). Fatal Invasive Infection with *Fungemia* Due to *Microascus cirrosus* after Heart and

- Lung Transplantation in a Patient with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), 2743-2747.
- Miraldi, F., Anile, M., Ruberto, F., Tritapepe, L., Puglese, F., Quattrucci, S., Venuta, F. (2012). *Scedosporium apiospermum* atrial mycetomas after lung transplantation for cystic fibrosis. *Transplant Infectious Disease*, 14(2), 188-191.
- Moniz, S., Sousa, M., Moraes, B. J., Mendes, A. I., Palma, M., Barreto, C., Matos, P. (2013). HGF stimulation of Rac1 signaling enhances pharmacological correction of the most prevalent cystic fibrosis mutant F508del-CFTR. *ACS Chemical Biology*, 8(2), 432-442.
- Montes-Cano, M. A., de la Horra, C., Dapena, F. J., Mateos, I., Friaiza, V., Respaldiza, N., Varela, J. M. (2007). Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(10), 1008-1011.
- Moreira, A. S., Silva, D., Ferreira, A. R., & Delgado, L. (2014). Antifungal treatment in allergic bronchopulmonary aspergillosis with and without cystic fibrosis: a systematic review. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 44(10), 1210-1227.
- Moreno Galdó, A., Solé Montserrat, J., & Roman Broto, A. (2013). Lung transplantation in children. Specific aspects. *Archivos De Bronconeumología*, 49(12), 523-528.
- Morio, F., Horeau-Langlard, D., Gay-Andrieu, F., Talarmin, J.-P., Haloun, A., Treilhaud, M., Miegville, M. (2010). Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheria* Infection after Double-Lung Transplantation in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1978-1982.
- Moss, R. B., Mistry, S. J., Konstan, M. W., Pilewski, J. M., Kerem, E., Tal-Singer, R., CF2110399 Investigators. (2013). Safety and early treatment effects of the CXCR2 antagonist SB-656933 in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 12(3), 241-248.
- Mowat, E., Rajendran, R., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., Lang, S., & Ramage, G. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 313(2), 96-102.
- Nagano, Y., Elborn, J. S., Millar, B. C., Walker, J. M., Goldsmith, C. E., Rendall, J., & Moore, J. E. (2010). Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Medical Mycology*, 48(1), 166-176.e1.
- Nash, E. F., Coonar, A., Kremer, R., Tullis, E., Hutcheon, M., Singer, L. G., Chaparro, C. (2010). Survival of *Burkholderia cepacia* sepsis following lung transplantation in recipients with cystic fibrosis. *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, 12(6), 551-554.
- Neto, F. M. F. D., Camargo, P. C. L. B., Costa, A. N., Teixeira, R. H. O. B., Carraro, R. M., Afonso, J. E., ... Pêgo-Fernandes, P. M. (2014). Fungal infection by Mucorales order in lung transplantation: 4 case reports. *Transplantation Proceedings*, 46(6), 1849-1851.
- Nixon, G. M., Armstrong, D. S., Carzino, R., Carlin, J. B., Olinsky, A., Robertson, C. F., & Grimwood, K. (2001). Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics*, 138(5), 699-704.
- Noel, S., Dhooghe, B., & Leal, T. (2012). PDE5 Inhibitors as Potential Tools in the Treatment of Cystic Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 167.
- Olland, A., Falcoz, P.-E., Kessler, R., & Massard, G. (2012). Should cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia* complex be listed for lung transplantation? *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 13(6), 631-634.
- Orens, J. B., Estenne, M., Arcasoy, S., Conte, J. V., Corris, P., Egan, J. J., Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. (2006). International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update-a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*, 25(7), 745-755.
- Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B. D., Kett, D. H., Vazquez, J., Pappas, P. G., Saeki, F., Rex, J. H. (2005). Multicenter clinical evaluation of the (1->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(5), 654-659.

- Palmer, K. L., Mashburn, L. M., Singh, P. K., & Whiteley, M. (2005). Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *Journal of Bacteriology*, *187*(15), 5267-5277.
- Poradzka A, Jasik M, Karnafel W, Fiedor P. (2013). Clinical aspects of fungal infections in diabetes. *Acta poloniae pharmaceutica*, *70*(4), 587-96.
- Pederiva, M. A., Wissmann, G., Friaza, V., Morilla, R., de La Horra, C., Montes-Cano, M. A., Prolla, J. C. (2012). High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Medical Mycology*, *50*(5), 556-560.
- Petersen, N. T., Høiby, N., Mordhorst, C. H., Lind, K., Flensburg, E. W., & Bruun, B. (1981). Respiratory infections in cystic fibrosis patients caused by virus, chlamydia and mycoplasma--possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Paediatrica Scandinavica*, *70*(5), 623-628.
- Pihet, M., Carrere, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F., & Bouchara, J.-P. (2009). Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Medical Mycology*, *47*(4), 387-397.
- Pittman, J. E., & Ferkol, T. W. (2015). The Evolution of Cystic Fibrosis Care. *Chest*, *148*(2), 533-542.
- Quintana-Gallego, E., Ruiz-Ramos, M., Delgado-Pecellin, I., Calero, C., Soriano, J. B., & Lopez-Campos, J. L. (2015). Mortality from cystic fibrosis in Europe: 1994-2010. *Pediatric Pulmonology*.
- Quinton, P. M. (2008). Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet (London, England)*, *372*(9636), 415-417.
- Quon, B. S., Reid, J. D., Wong, P., Wilcox, P. G., Javer, A., Wilson, J. M., & Levy, R. D. (2011). *Burkholderia gladioli* – a predictor of poor outcome in cystic fibrosis patients who receive lung transplants? A case of locally invasive rhinosinusitis and persistent bacteremia in a 36-year-old lung transplant recipient with cystic fibrosis. *Canadian Respiratory Journal: Journal of the Canadian Thoracic Society*, *18*(4), e64-e65.
- Respaldiza, N., Montes-Cano, M. A., Dapena, F. J., de la Horra, C., Mateos, I., Medrano, F. J., ... Varela, J. M. (2005). Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *11*(12), 1012-1015.
- Respaldiza, N., Montes-Cano, M. A., Friaza, V., Muñoz-Lobato, F., Medrano, F. J., Varela, J. M., De la Horra, C. (2006). Usefulness of oropharyngeal washings for identifying *Pneumocystis jirovecii* carriers. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *53* Suppl 1, S100-101.
- Rodriguez-Tudela, J. L., Alastruey-Izquierdo, A., Gago, S., Cuenca-Estrella, M., León, C., Miro, J. M., University of Manchester in association with the LIFE program. (2015). Burden of serious fungal infections in Spain. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *21*(2), 183-189.
- Rogers, C. S., Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., Ostedgaard, L. S., Rokhlina, T., Taft, P. J., Welsh, M. J. (2008). Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5897), 1837-1841.
- Rogers, G. B., Carroll, M. P., Serisier, D. J., Hockey, P. M., Jones, G., & Bruce, K. D. (2004). characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(11), 5176-5183.
- Russell, G. K., Gadhok, R., & Simmonds, N. J. (2013). The destructive combination of *Scediosporium apiosperum* lung disease and exuberant inflammation in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, *14*, Supplement 1, 22-25.
- Sabino, R., Ferreira, J. A. G., Moss, R. B., Valente, J., Veríssimo, C., Carolino, E., Stevens, D. A. (2015). Molecular epidemiology of *Aspergillus* collected from cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, *14*(4), 474-481.
- Saiman, L., Siegel, J. D., LiPuma, J. J., Brown, R. F., Bryson, E. A., Chambers, M. J., Society for Healthcare Epidemiology of America. (2014). Infection prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *35* Suppl 1, S1-S67.
- Salizzoni, S., Pilewski, J., & Toyoda, Y. (2014). Lung transplant for a patient with cystic fibrosis and active *Burkholderia Cenocepacia* pneumonia. *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, *12*(5), 487-489.

- Savi, D., De Biase, R. V., Amaddeo, A., Anile, M., Venuta, F., Ruberto, F., Quattrucci, S. (2014). *Burkholderia pyrrocinia* in cystic fibrosis lung transplantation: a case report. *Transplantation Proceedings*, 46(1), 295-297.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16):6241-6.
- Sherrard, L. J., Tunney, M. M., & Elborn, J. S. (2014). Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *Lancet (London, England)*, 384(9944), 703-713.
- Shimizu, Y., Sunaga, N., Dobashi, K., Fueki, M., Fueki, N., Makino, S., Mori, M. (2009). Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BMC Infectious Diseases*, 9:47.
- Sibley, C. D., Grinwis, M. E., Field, T. R., Eshaghurshan, C. S., Faria, M. M., Dowd, S. E., Surette, M. G. (2011). Culture enriched molecular profiling of the cystic fibrosis airway microbiome. *PLoS One*, 6(7), e22702.
- Silveira, F. P., Kwak, E. J., Paterson, D. L., Pilewski, J. M., McCurry, K. R., & Husain, S. (2008). Post-transplant colonization with non-Aspergillus molds and risk of development of invasive fungal disease in lung transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*, 27(8), 850-855.
- Sing, A., Geiger, A. M., Hogardt, M., & Heesemann, J. (2001). *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2717-2718.
- Sing, A., Roggenkamp, A., Autenrieth, I. B., & Heesemann, J. (1999). *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3409-3410.
- Sing, A., Trebesius, K., Roggenkamp, A., Rüssmann, H., Tybus, K., Pfaff, F., Heesemann, J. (2000). Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4), 1461-1467.
- Singh, N., & Paterson, D. L. (2005). Aspergillus infections in transplant recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), 44-69.
- Smyth, A. R., Bell, S. C., Bojcin, S., Bryon, M., Duff, A., Flume, P., European Cystic Fibrosis Society. (2014). European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 13 Suppl 1, S23-42.
- Solé, A. (2011). Infección diseminada por *Scedosporium apiospermum* en un receptor de trasplante pulmonar unilateral. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(3), 139-142.
- Solé, A., Vicente, R., Morant, P., Salavert, M., Santos, M., Morales, P., & Pastor, A. (2006). [Lung transplantation for cystic fibrosis: infectious events]. *Medicina Clínica*, 126(7), 255-258.
- Spivey, J. F., Singleton, D., Sweet, S., Storch, G. A., Hayashi, R. J., Huddleston, C. B., & Danziger-Isakov, L. A. (2007). Safety and efficacy of prolonged cytomegalovirus prophylaxis with intravenous ganciclovir in pediatric and young adult lung transplant recipients. *Pediatric Transplantation*, 11(3), 312-318.
- Stanzi, A., Decaluwe, H., Coosemans, W., De Leyn, P., Naftoux, P., Van Veer, H., Van Raemdonck, D. (2014). Lobar lung transplantation from deceased donors: a valid option for small-sized patients with cystic fibrosis. *Transplantation Proceedings*, 46(9), 3154-3159.
- Stevens, D. A., Moss, R. B., Kurup, V. P., Knutsen, A. P., Greenberger, P., Judson, M. A., Participants in the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. (2003). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 37 Suppl 3, S225-264.
- Stringer, J. R., Beard, C. B., Miller, R. F., & Wakefield, A. E. (2002). A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 891-896.
- Sudfeld, C. R., Dasenbrook, E. C., Merz, W. G., Carroll, K. C., & Boyle, M. P. (2010). Prevalence and risk factors for recovery of filamentous fungi in individuals with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 9(2), 110-116.

- Suhling, H., Rademacher, J., Greer, M., Haverich, A., Warnecke, G., Gottlieb, J., & Welte, T. (2013). Inhaled colistin following lung transplantation in colonised cystic fibrosis patients. *The European Respiratory Journal*, *42*(2), 542-544.
- Symoens, F., Knoop, C., Schrooyen, M., Denis, O., Estenne, M., Nolard, N., & Jacobs, F. (2006). Disseminated *Scedosporium apiospermum* Infection in a Cystic Fibrosis Patient After Double-lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, *25*(5), 603-607.
- Tang, A. C., Turvey, S. E., Alves, M. P., Regamey, N., Tümmler, B., & Hartl, D. (2014). Current concepts: host-pathogen interactions in cystic fibrosis airways disease. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, *23*(133), 320-332.
- Theunissen, C., Knoop, C., Nonhoff, C., Byl, B., Claus, M., Liesnard, C., Jacobs, F. (2008). Clostridium difficile colitis in cystic fibrosis patients with and without lung transplantation. *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, *10*(4), 240-244.
- Thomas, S. R., Ray, A., Hodson, M. E., & Pitt, T. L. (2000). Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax*, *55*(9), 795-797.
- Thomson, S., Alibhai, K., Winkelaar, G., Lien, D., Halloran, K., Kapasi, A., & Weinkauf, J. (2015). Case report of vertebral osteomyelitis and mycotic abdominal aortic aneurysm caused by *Scedosporium apiospermum* in a lung transplant patient with cystic fibrosis. *Transplantation Proceedings*, *47*(1), 204-209.
- Tofte, N., Jensen, C., Tvede, M., Andersen, C. B., Carlsen, J., & Iversen, M. (2012). Use of prophylactic voriconazole for three months after lung transplantation does not reduce infection with *Aspergillus*: a retrospective study of 147 patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, *44*(11), 835-841.
- Trapnell, B. C., McColley, S. A., Kissner, D. G., Rolfe, M. W., Rosen, J. M., McKeivitt, M., Phase 2 FTI Study Group. (2012). Fosfomycin/tobramycin for inhalation in patients with cystic fibrosis with pseudomonas airway infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *185*(2), 171-178.
- Vadnerkar, A., Clancy, C. J., Celik, U., Yousem, S. A., Mitsani, D., Toyoda, Y., Nguyen, M. H. (2010). IMPACT OF MOULD INFECTIONS IN EXPLANTED LUNGS ON OUTCOMES OF LUNG TRANSPLANTATION. *Transplantation*, *89*(2), 253-260.
- Valerius, N. H., Koch, C., & Høiby, N. (1991). Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet (London, England)*, *338*(8769), 725-726.
- Van Daele, S. G., Franckx, H., Verhelst, R., Schelstraete, P., Haerynck, F., Van Simaey, L., de Baets, F. (2005). Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis rehabilitation centre. *The European Respiratory Journal*, *25*(3), 474-481.
- Van Ewijk, B. E., Wolfs, T. F. W., Aerts, P. C., Van Kessel, K. P. M., Fleer, A., Kimpen, J. L. L., & Van der Ent, C. K. (2007). RSV mediates *Pseudomonas aeruginosa* binding to cystic fibrosis and normal epithelial cells. *Pediatric Research*, *61*(4), 398-403.
- Varela, J. M., Dapena, J., Regordán, C., Blanco, M., González de la Puente, M. A., & Calderón, E. J. (1998). Absence of *Pneumocystis carinii* carriers among patients with cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *17*(10), 741-742.
- Varela, J.M., Dapena, J., Montes-Cano, M.A., De la Horra, C., Medrano, F.J., Respaldiza, N., De la Santa, E., Calderón, E. (2004). Colonización por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con fibrosis quística receptores de trasplante pulmonar. En *Actualizaciones en trasplantes 2004* (pp. 389-393).
- Villena, J., Racedo, S., Agüero, G., Bru, E., Medina, M., & Alvarez, S. (2005). *Lactobacillus casei* improves resistance to pneumococcal respiratory infection in malnourished mice. *The Journal of Nutrition*, *135*(6), 1462-1469.
- Vital, D., Hofer, M., Benden, C., Holzmann, D., & Boehler, A. (2013a). Impact of sinus surgery on pseudomonas airway colonization, bronchiolitis obliterans syndrome and survival in cystic fibrosis lung transplant recipients. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, *86*(1), 25-31.
- Vital, D., Holzmann, D., Boehler, A., & Hofer, M. (2013b). Chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a risk factor for nasal polyposis after lung transplantation. *Transplantation*, *95*(12), 1548-1553.

- Wahab, A. A., Janahi, I. A., Marafia, M. M., & El-Shafie, S. (2004). Microbiological identification in cystic fibrosis patients with CFTR I1234V mutation. *Journal of Tropical Pediatrics*, 50(4), 229-233.
- Wainwright, C. E., Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., TRANSPORT Study Group. (2015). Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *The New England Journal of Medicine*, 373(3), 220-231.
- Wainwright, C. E., Vidmar, S., Armstrong, D. S., Byrnes, C. A., Carlin, J. B., Cheney, J., ACFBAL Study Investigators. (2011). Effect of bronchoalveolar lavage-directed therapy on *Pseudomonas aeruginosa* infection and structural lung injury in children with cystic fibrosis: a randomized trial. *JAMA*, 306(2), 163-171.
- Wakefield, A. E., Miller, R. F., Guiver, L. A., & Hopkin, J. M. (1993). Oropharyngeal samples for detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. *The Quarterly Journal of Medicine*, 86(6), 401-406.
- Walicka-Serzysko, K., & Sands, D. (2015). The clinical presentations of pulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis - preliminary report. *Developmental Period Medicine*, 19(1), 66-79.
- Wang, E. H. Z., Partovi, N., Levy, R. D., Shapiro, R. J., Yoshida, E. M., & Greanya, E. D. (2012). *Pneumocystis pneumonia* in solid organ transplant recipients: not yet an infection of the past. *Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society*, 14(5), 519-525.
- Wat, D., Gelder, C., Hibbitts, S., Cafferty, F., Bowler, I., Pierrepont, M., Doull, I. (2008). The role of respiratory viruses in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 7(4), 320-328.
- Waters, V., Atenafu, E. G., Lu, A., Yau, Y., Tullis, E., & Ratjen, F. (2013). Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and mortality or lung transplantation in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 12(5), 482-486.
- Willment, J. A., Gordon, S., & Brown, G. D. (2001). Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43818-43823.
- Willner, D., Haynes, M. R., Furlan, M., Hanson, N., Kirby, B., Lim, Y. W., Rohwer, F. (2012). Case Studies of the Spatial Heterogeneity of DNA Viruses in the Cystic Fibrosis Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(2), 127-131.
- Wong, J. Y., Chambers, A. L., Fuller, J., Lacson, A., Mullen, J., Lien, D., & Humar, A. (2014). Successful lung transplant in a child with cystic fibrosis and persistent *Blastobotrys rhaffinosifermentans* infection. *Pediatric Transplantation*, 18(5), E169-173.
- Yoon, S. S., Hennigan, R. F., Hilliard, G. M., Ochsner, U. A., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., Hassett, D. J. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental Cell*, 3(4), 593-603.
- Zhao, J., Schloss, P. D., Kalikin, L. M., Carmody, L. A., Foster, B. K., Petrosino, J. F., LiPuma, J. J. (2012). Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5809-5814.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CFTR: Gen regulador de la conductancia transmembrana

DM: Diabetes Mellitus

dNTP: Deoxinucleótidostrifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EE.UU: Estados Unidos

ELISA: del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

FDA: del inglés Food and Drug Administration, Agencia de Alimentos y Medicamentos

FEV1: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo

FQ: Fibrosis Quística

IBiS: Instituto de Biomedicina de Sevilla

ISHLT: del inglés International Society for Heart and Lung Transplantation, Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón

LBA: Lavado broncoalveolar

LOF: Lavado orofaríngeo

mt LSU rRNA: ARN ribosómico de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial

PcP: del inglés Pneumocystis Carinii Pneumonia o PneumoCystis Pneumonia, Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*

PCR: del inglés Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa

UE: Unión Europea

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ANEXOS

ANEXO I: Cuaderno de Recogida de Datos y Consentimiento informado

Cuaderno de recogida de datos

1. Código del centro ⁽¹⁾: _____.
2. Código del caso ⁽²⁾: _____.
3. Fecha de inclusión (d/m/a): _____.

DATOS DEMOGRÁFICOS

4. Nombre del paciente (iniciales) ⁽³⁾ _____.
5. Sexo (V/M) ____.
6. Raza (blanca, otras) _____.
7. Fecha de nacimiento (d/m/a): (__ / __ / __).
8. Lugar de nacimiento (localidad): _____.
9. Lugar de nacimiento (provincia): _____.
10. Residencia habitual (localidad): _____.
11. Residencia habitual (provincia): _____.

ANTECEDENTES PERSONALES

	Sí	No
12. Diabetes		
13. Enfermedad hepática (transaminasas >2 rango de normalidad)		
14. Insuficiencia renal (creatinina sérica > 2 mg/dl)		
15. Neoplasia (si la respuesta es Sí, especificar: _____)		
16. Otros (si la respuesta es Sí, especificar: _____)		
17. Receptor de hemoderivados		
18. Factor de riesgo para infección por VIH		
19. Tabaquismo (si la respuesta es Sí, especificar número de paquetes-año: _____) ⁽⁴⁾		
20. Consumo de alcohol (si la respuesta es Sí, especificar g/día: _____)		

ENFERMEDAD PULMONAR

Sí No

21. Enfermedad crónica pulmonar

--	--

21.1. Bronquitis Crónica

--	--

21.2. Enfisema

--	--

21.3. Bronquiectasias

--	--

21.4. Asma obstructiva crónica

--	--

21.5. Fibrosis quística

--	--

21.6. Otras (si la respuesta es Sí, especificar)

--	--

22. Presenta actualmente el enfermo una **exacerbación** de su enfermedad pulmonar si la respuesta es Sí, especificar: leve, moderada o severa

--	--

23. Existe actualmente evidencia microbiológica de cualquier **otra infección pulmonar** Si la respuesta es Sí, especificar etiología Si la respuesta es Sí, especificar método de identificación

--	--

24. Uso de **esteroides en los últimos 6 meses** Si la respuesta es Sí, especificar: inhalados (IN) / orales (OR) / ambos (AM) Si la respuesta es Sí, especificar: número total de días de tratamiento (últimos 6 m.)

--	--

25. Uso de **otros agentes inmunomoduladores⁽⁵⁾ en los últimos 6 meses** Si la respuesta es Sí, especificar el fármaco

--	--

26. Uso de **cotrimoxazol en los últimos 6 meses** Si la respuesta es Sí especificar: número total de días de tratamiento y dosis total de sulfametoxazol en gramos (últimos 6 meses)

--	--

27. Uso de **otros fármacos con actividad anti-*P.cainii*⁽⁶⁾ en los últimos 6 meses** Si la respuesta es Sí, especificar el fármaco

EXAMENES COMPLEMENTARIOS

- 28. Hemoglobina (g/dl) _____.
- 29. WBC x 10⁹/l _____.
- 30. Neutrófilos x 10⁹/l _____.
- 31. Linfocitos x 10⁹/l _____.
- 32. Rx de tórax (especificar un número del 1 al 8) ⁽⁷⁾ _____.
- 33. pH _____.
- 34. pO₂ (mmHg) _____.
- 35. pCO₂ (mmHg) _____.
- 36. Creatinina sérica (mg/dl) _____.

	Realizada	No realizada
<p>37. Espirometría (en los últimos 3 meses):</p> <p>Si realizada:</p> <p>37.1. Fecha de realización (d/m/a): _____</p> <p>37.2. VEF₁, % teórico: ____</p> <p>37.3. VEF1/CV, % teórico: _____</p> <p>37.4. VEF1/CVF, porcentaje: ____</p>		
<p>38. Análisis microbiológico del esputo:</p> <p>Si realizada:</p> <p>38.1. Fecha de realización (d/m/a): _____</p> <p>38.2 Técnica de tinción: ____</p> <p>38.3 Identificación microbiológica (Sí/No): ____</p> <p>38.4. Si la respuesta es Sí, especificar microorganismo</p> <p>Si la respuesta es Sí, especificar microorganismo:</p> <p>_____</p>		

PROCESAMIENTO/ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

	Sí	No	Nº muestras	Código ⁽⁸⁾
39. Esputo (SP)				
40. Lavado orofaríngeo (OW)				
41. Suero (SE)				

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

	Positiva	Negativa
42. Nested-PCR de Esputo (<i>P. jirovecii</i>)		
43. PCR ITS		
44. PCR de Esputo (<i>P. aeruginosa</i>)		
45. PCR de Esputo (<i>S. pneumoniae</i>)		

46. Especificar especies fúngicas identificadas

CUANTIFICACIÓN DE B-GLUCANO (pg/ml)

	Suero 1	Suero 2
b-glucano		

NOTAS

¹ Usar las siguientes claves: H. Virgen del Rocío PC1, H. Tomillar PC2, H. San Sebastián PC3, H. J. Ramón Jiménez PC4, H. Reina Sofía PC5, H. Virgen de la Victoria PC6, H. Axarquía PC7, H. Costa del Sol PC8, H. Poniente PC9, H. San Cecilio PC10, H. Virgen del Camino PC11.

² Usar la clave del Centro seguida por un número correlativo para cada caso incluido. Por ejemplo: cuarto paciente de Valme: PC2/04.

³ Una sola inicial para el nombre y dos para los apellidos.

⁴ Este parámetro recoge la intensidad y duración global del hábito. Se calcula de la siguiente forma: Paquetes-año = Nº cigarrillos fumados al día/20 x años de hábito. Por ejemplo: a) Un paquete al día durante 1 año = 1 paquete-año, b) Dos paquetes durante dos años: 4 paquetes-año.

⁵ Incluir quimioterapia

⁶ Incluir pentamidina, dapsona, atovaquona, primaquina, clindamicina, pirimetamina, macrólidos.

⁷ 1= normal; 2= infiltrado alveolar; 3= infiltrado intersticial; 4= infiltrado mixto; 5= derrame pleural; 6= bronquiectasias; 7= bullas; 8= otras (especificar).

⁸ Código del caso/código de muestra seguido de un número correlativo para cada alícuota. Por ejemplo. Segunda alícuota de suero del paciente 4 de Valme. Código del caso: PC2/04; Código de la muestra: PC2/04/SU2.

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE/DONANTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

COLONIZACIÓN FÚNGICA EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA SOMETIDOS A TRASPLANTE PULMONAR

La siguiente información describe el estudio a realizar y las consideraciones más importantes sobre las infecciones que frecuentemente afectan a sujetos con **Fibrosis Quística**

Importancia:

La colonización persistente por patógenos bacterianos es uno de los factores que más contribuye al daño pulmonar y se han asociado al deterioro de la función pulmonar de estos pacientes. Pero, aunque son las bacterias los principales agentes infecciosos, algunos hongos pueden colonizar el tracto respiratorio de los pacientes con **Fibrosis Quística**.

El **objetivo** de este estudio es aportar información sobre los diferentes microorganismos fúngicos que colonizan el tracto respiratorio de sujetos con **Fibrosis Quística sometidos a trasplante** e intentar determinar cómo los microorganismos presentes pueden condicionar la evolución de esta enfermedad.

Los **procedimientos** del estudio consisten en el análisis de una muestra de esputo y/o lavado orofaríngeo, donde se determinará la presencia de microorganismos y de la muestra de sangre, donde se medirán los niveles de betaglucanos. Por tanto, usted no recibirá tratamiento en caso que se detecten microorganismos no patogénicos. Si usted presentara alguna sintomatología o la evolución clínica hiciese sospechar que estos microorganismos le pueden estar causando algún problema de salud usted recibirá tratamiento antibiótico específico frente al mismo, y recibirá todos los cuidados médicos necesarios para el control de su enfermedad.

A todos los participantes en el estudio se les pide su aceptación por escrito.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

Usted ya se encuentra en seguimiento en esta Unidad del Servicio de Respiratorio y es revisado de forma periódica. Para realizar nuestro estudio sólo necesitamos una muestra de esputo y/o de lavado orofaríngeo y una muestra de sangre y no supondrá para usted ninguna actuación más de las que habitualmente se le realizan en las revisiones clínicas en esta Unidad.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal del laboratorio CIBERESP en el teléfono: 955923095 o en el correo electrónico: sandube@cica.es; cdlhorra-ibis@us.es.

ANEXO II: Protocolo de extracción de ADN

- 1.** La muestra previamente digerida a 56°C se lisa con 200 µl de B3. Se agita vigorosamente y se mezcla.
- 2.** Se deja reposar a temperatura ambiente unos minutos.
- 3.** Se añaden 210 µl de Etanol 100% y se agita inmediatamente.
- 4.** Se deposita la muestra previamente tratada en una columna y un tubo colector de 2 ml, ambos rotulados convenientemente.
- 5.** Se centrifuga 1 min a 10000 rpm.
- 6.** Se desecha el líquido del tubo colector.
- 7.** Se añaden 500 µl de BW.
- 8.** Se centrifuga 1 min a 10000 rpm y se desecha el líquido.
- 9.** Se añaden 600 µl de B5 y centrifugar 1 min a 10000 rpm.
- 10.** Se coloca la columna en un tubo colector limpio.
- 11.** Se centrifuga 3 min a máxima velocidad.
- 12.** Se descarta el tubo colector y se coloca la columna en un eppendorf limpio.
- 13.** Se eluye el ADN añadiendo 55 µl de agua ultrapura.
- 14.** Se deja reposar unos minutos y se centrifuga 1 min a máxima velocidad.
- 15.** El ADN obtenido se congela a -20°C hasta su uso.

ANEXO III: Identificación de genotipos de mt LSU rRNA mediante secuenciación directa

Tras la identificación de *P. jirovecii* en una muestra de lavado orofaríngeo obtenido de un sujeto con Fibrosis Quística se procede a la secuenciación del fragmento de ADN amplificado.

Es necesaria la purificación de los productos de PCR mediante cromatografía de exclusión molecular para la obtención de ADN susceptible de ser secuenciado. Se procede con el protocolo que se detalla a continuación:

1. Se utiliza una columna por cada muestra.
2. Añadimos 650 µl de agua destilada-autoclavada en un eppendorf de 1.5 ml.
3. Centrifugar durante 1min a 3000 rpm dos veces; secar después el extremo.
4. Añadir a la columna Sephacryl-S400.
5. Se coloca de nuevo la columna en el eppendorf para eliminar el buffer y compactar el polímero. Centrifugar 2 min a 3000 rpm. Se descarta el buffer y se seca el extremo de la columna. Este lavado se repite en dos ocasiones más.
6. Añadimos 25 µl de ADN amplificado en la columna (añadir lentamente y por el centro de la columna).
7. Se coloca la columna en un tubo eppendorf limpio y rotulado.
8. Se centrifugamos 2,5 min a 3000 rpm.
9. Se vuelve a testar el fragmento purificado en gel de agarosa (5 µl de ADN + 1,5 µl de Blue Juice).

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Cada reacción de secuenciación debe contener: 5 µl de ADN purificado; 4 µl de premix (suministrada por Applied Biosystems) y 1 µl de primer a 3 pmoles de concentración.

Programa de Secuenciación

3 min a	94°C	} 25 ciclos
10 s	95°C	
5 s	50°C	
4 min a	60°C ilimitado a 4°C	

PRECIPITACIÓN DEL PRODUCTO DE SECUENCIACIÓN

1. Rotulamos un tubo eppendorf por cada muestra.
2. Se añaden:

9,5 µl de Cl_2Mg 2 mM.

27,5 µl de etanol absoluto a 95%.

10 µl de la reacción de secuenciación.

3. Se incuba 12 min a RT y se centrifuga 20 min a 14000 rpm.
4. Se elimina la solución de etanol, procurando no tocar el pellet y usando punta de

pipeta plana.

5. Añadir 125 μ l de etanol al 70%.

6. Se centrifuga durante 10 min a 14000 rpm.

7. Decantar la solución de etanol.

8. Dar un pulso y eliminar al máximo con una punta estirada el sobrenadante.

9. Incubar durante 10-15 minutos a 37°C para que se evapore por completo el etanol y dejar el pellet bien seco.

Antes de realizar la electroforesis se añaden 25 μ l de TSR, y se incuba 10 min a RT.

Posteriormente damos un vórtex a cada tubo, desnaturalizamos 3 min a 94°C en bloque seco.

Pulso de centrifuga a 14000 rpm, vórtex, y se cambia a tubos eppendorf de 0,5 μ l.

En este punto las muestras están preparadas para la electroforesis en el secuenciador.

