

UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

**ESTUDI DE LA POBLACIÓ BACTERIANA ENDOBRONQUIAL
EN LA MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.
APLICACIÓ DEL RASPALL PROTEGIT**

Antoni Rossell i Gratacós

ÍNDIX

1. PREÀMBUL

1.1	Context.....	1
1.2	Abreviacions.....	2
1.3	Relació taules.....	3

2. INTRODUCCIÓ

2.1	Definicions.....	5
2.2	Mètodes diagnòstics de la infecció bronquial	
2.2.1	<i>Esput</i>	15
2.2.2	<i>Punció aspiració transtraqueal</i>	20
2.2.3	<i>Immunologia</i>	22
2.2.4	<i>Tècniques broncoscòpiques</i>	
	a. Rentada broncoalveolar.....	25
	b. Raspall protegit.....	29
2.3	Factors del germen i de l'hoste que afavoreixen la colonització	
2.3.1	<i>Deficient aclariment mucociliar</i>	56
2.3.2	<i>Mecanismes immunològics locals</i>	59
2.3.3	<i>Mecanismes adaptatius dels gèrmens</i>	63
2.4	Microbiologia de la colonització i infecció	
2.4.1	<u><i>H. influenzae, S. pneumoniae, M. Catarrhalis</i></u>	71
2.4.2	<u><i>C. Pneumoniae, M. Pneumoniae, virus respiratoris</i></u>	77
2.4.3	<i>Microorganismes no potencialment patògens</i>	81

2.4.4	<i>Poblacions polimicrobianes.....</i>	86
2.4.5	<i>La flora orofaríngia en la MPOC.....</i>	87
2.5	Paper de la infecció en l'agudització de la MPOC	
2.5.1	<i>Aïllament de bacteris durant les exacerbacions.....</i>	89
2.5.2	<i>Eficàcia del tractament antibiòtic en les exacerbacions.....</i>	91
2.5.3	<i>Negativització dels cultius després d'antibiòticoterapia.....</i>	94
2.6	Paper de la infecció en el desenvolupament de la MPOC i evolució de la mateixa	
2.6.1	<i>Evidència d'infecció bacteriana en els pacients amb MPOC estable.....</i>	94
2.6.2	<i>Efecte de les aguditzacions.....</i>	95
2.6.3	<i>Evidència d'inflamació en la MPOC estable i aguditzada.....</i>	96
2.6.4	<i>La inflamació crònica com a causa de dany histològic</i>	102
2.6.5	<i>La infecció bacteriana en la infecció crònica de la via aèria. Hipòtesi del "cercle viciós"</i>	104
2.7	Efectes del tabaquisme sobre la via aèria.....	106
3.	OBJECTIUS.....	109
4.	PUBLICACIONS	
4.1	Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis Monso,E.; Rosell,A.; Bonet,G.; Manterola,J.; Cardona,P.J.; Ruiz,J.; Morera,J. <i>Eur. Respir J</i> 1999; 13:338-2.....	113

4.2 Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush .Monso,E.; Ruiz,J.; Rosell,A.; Manterola,J.; Fiz,J.; Morera,J.; Ausina,V.

American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine

1995;152:1316-20..... 115

5. **LIMITACIONS I BIAIXOS DELS ESTUDIS** 117

6. **DISCUSSIÓ**..... 121

7. **CONCLUSIONS**.....127

8. **BIBLIOGRAFIA**..... 128

1. PREÀMBUL

1.1 CONTEXT DE LA TESI DOCTORAL

Aquesta tesi s'emmarca dins d'una de les línies d'investigació del Servei de Pneumologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona. La línia de recerca sobre la Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica (MPOC) iniciada a mitjans dels 80, ha estat abordada des de diverses vessants, sovint en col·laboració amb altres grups d'investigació en l'àmbit pneumològic. Estudis sobre la intervenció de la infecció utilitzant el raspall protegit en població ambulatoria (1,2), estudis sobre antibioticoteràpia inhalada en pacients amb MPOC i bronquièctasi colonitzades per *Pseudomona* (3), estudis epidemiològics sobre els factors que acompanyen les aguditzacions que requereixen hospitalització, estudis epidemiològics sobre la influència de l'activitat laboral agrícola i ramadera en la patologia pulmonar obstructiva (4) , estudis sobre tabaquisme (5,6) i estudis sobre qualitat de vida en diversos subgrups de pacients amb MPOC (7,8), són apartats on s'ha desenvolupat la tasca investigadora.

Els dos articles que es presenten com a base per la Tesi Doctoral són els desenvolupats des del Gabinet de Broncoscòpies, utilitzant el raspall protegit via broncoscopi flexible, com a mostra microbiològica endoluminal.

1.2 ABREVIACIONS

MPOC: Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica

FEV1%: volum espirat en el 1er segon en l'espirometria forçada

FVC: capacitat vital forçada

UFC/ml : unitats formadores de colònies per mil·lilitre

RBA: rentada broncoalveolar

MPP: microorganismes potencialment patògens

MnPP: microorganismes no potencialment patògens

PEM: proteïnes externes de la membrana

LOS: lipooligosacàrids

ELISA: enzyme linked immunoabsorbent assay

ON: òxid nítric

H₂O₂: peròxid d'hidrogen

TAC: tomografia axial computeritzada

IL: interleucina

OR: odds ratio

1.3 RELACIÓ DE TAULES I FIGURES

TAULA 1. CLASSIFICACIONS DEL GRAU D'OBSTRUCCIÓ SEGONS LA NORMATIVA DE L'ERS I L'ATS.....	6
TAULA 2. CLASSIFICACIÓ DE MURRAY-WASHINGTON.....	16
TAULA 3. AÏLLAMENTS BACTERIANS DEL GRUP 1 I GRUP 5 DE MURRAY-WASHINGTON, I DELS ASPIRATS TRANSTRAQUEALS (ATT)	17
TAULA 4 . CULTIUS D'ESPUT EN LA MPOC AGUDITZADA.....	19
TAULA 5. CULTIUS D'ESPUT EN LA BC ESTABLE.....	20
TAULA 6. ASPIRATS TRANSTRAQUEALS EN LA MPOC ESTABLE I AGUDITZADA.....	22
TAULA 7. LA RENTADA BRONCO-ALVEOLAR EN LA MPOC (ESTABLE I AGUDITZADA)	28
TAULA 8. RASPALL PROTEGIT EN SUBJECTES NORMALS.....	41
TAULA 9. CORRELACIÓ ENTRE RASPALL PROTEGIT I ESPUT	42
TAULA 10. PUNT DE TALL DEL RASPALL PROTEGIT EN EL DIAGNÒSTIC DE PNEUMÒNIA, EXPRESSAT COM A ÍNDEX BACTERIÀ.....	45
TAULA 11. PUNT DE TALL DEL RASPALL PROTEGIT UTILITZAT PELS DIFERENTS AUTORS.....	45
TAULA 12. PATRÓ BACTERIÀ EN SUBJECTES SANS, MPOC ESTABLE AGUDITZADA.....	47
TAULA 13 . DISTRIBUCIÓ DE LA POBLACIÓ BACTERIANA SEGONS CONCENTRACIONS.....	48
TAULA 14. PROPORCIÓ DE MPP I MnPP EN SUBJECTES SANS, MPOC ESTABLE I AGUDITZADA	50
TAULA 15. DISTRIBUCIÓ DELS MPP I MnPP SEGONS LA SEVA CONCENTRACIÓ EN SUBJECTES SANS, MPOC ESTABLE I AGUDITZADA.....	51
TAULA 16. DISTRIBUCIÓ DEL MPP SEGONS LES SEVES CONCENTRACIONS EN LA MPOC ESTABLE.....	54
TAULA 17. DISTRIBUCIÓ DELS MPP SEGONS LES SEVES CONCENTRACIONS EN LA MPOC AGUDITZADA.....	54
TAULA 18. FACTORS DE VIRULÈNCIA DELS BACTERIS CAUSANTS D'INFECCIÓ BRONQUIAL	63
TAULA 19. ADHERÈNCIA BACTERIANA SOBRE DIFERENTS SUPERFÍCIES	67
TAULA 20. FACTORS DE VIRULÈNCIA DELS BACTERIS CAUSANTS D'INFECCIONS EN LA MPOC.....	70
TAULA 21. <i>CHLAMYDIA PNEUMONIAE</i> EN LA MPOC AGUDITZADA.....	78
TAULA 22. MnPP COM A RESPONSABLE DE L'EXACERBACIÓ DE LA MPOC.....	82

TAULA 23. N ^o D'AÏLLAMENTS DE MICROORGANISMES NO POTENCIALMENT PATÒGENS (MnPP) EN SUBJECTES SANS	83
TAULA 24. N ^o D'AÏLLAMENTS DE MICROORGANISMES NO POTENCIALMENT PATÒGENS (MnPP) EN MPOC ESTABLE	84
TAULA 25. N ^o D'AÏLLAMENTS DE MICROORGANISMES NO POTENCIALMENT PATÒGENS (MnPP) EN MPOC AGUDITZADA.....	85
TAULA 26. AÏLLAMENTS DE MnPP EN SUBJECTES SANS, MPOC ESTABLE I AGUDITZADA (GRUP VIRIDANS JUNT)	86
TAULA 27. POBLACIONS POLIMICROBIANES	87

RELACIÓ DE FIGURES

FIGURA 1. CULTIUS POSITIUS I CÀRREGA BACTERIANA SEGONS LA SITUACIÓ CLÍNICA.....	48
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓ DE LA POBLACIÓ BACTERIANA SEGONS CONCENTRACIONS EN LES DIFERENTS SITUACIONS CLÍNiques.....	49
FIGURA 3. TIPUS DE POBLACIÓ (MPP) I (MnPP) SEGONS LA SITUACIÓ CLÍNICA	51
FIGURA 4. DISTRIBUCIÓ DE LES POBLACIONS DE MnPP (1er GRÀFIC) I MPP (2on GRÀFIC) SEGONS CONCENTRACIONS BACTERIANA.....	53
FIGURA 5. DISTRIBUCIÓ DELS MPP EN LA MPOC ESTABLE I AGUDITZADA.....	55

2. INTRODUCCIÓ

2.1 DEFINICIONS

2.1.1 MPOC (Malaltia pulmonar obstructiva crònica) i emfisema

Segons articula la Societat Europea de Pneumologia (ERS, European Respiratory Society) (9) es refereix en aquella entitat nosològica caracteritzada per una reducció del pic de flux màxim i buidament lent dels pulmons en l'inspiració forçada; característiques que no varien excessivament al llarg dels mesos. Aquesta limitació al flux aeri és majoritàriament irreversible i lentament progressiva i es deu a varies combinacions d'alteracions de la via aèria i d'emfisema. La contribució relativa d'ambdós processos és difícil de definir *in vivo*.

L'únic requeriment pel diagnòstic és una espirometria alterada, encara que hi ha d'altres causes d'obstrucció al flux aeri (per exemple, obstrucció extratoràcica, obstrucció intrabronquial o fibrosi quística) que queden excloses.

Havent descartat tot aquest grup d'etiologies, queda el tabac com a factor principal. La clínica no forma part del diagnòstic, a diferència del que estableix la ATS (American Thoracic Society) en què la MPOC es defineix per "presència d'obstrucció al flux aeri deguda a bronquitis crònica o emfisema" (10).

S'estableixen 3 categories d'obstrucció en funció del percentatge del volum espirat en el 1er segon en una espirometria forçada (FEV1%). Els graus també són diferents en l'ERS i en la ATS.

Taula 1. Classificacions del grau d'obstrucció segons la normativa de l'ERS i l'ATS

	ERS	ATS
GRAU I: LLEU	70 %	50 %
GRAU II: MODERAT	50-69 %	35-49 %
GRAU III: GREU	< 50 %	< 35 %

L'emfisema és defineix anatòmicament per una dilatació permanent dels espais distals als bronquiolos terminals, per un procés destructiu que cursa sense fibrosi rellevant.

2.1.2 Bronquitis crònica

Presència de secreció bronquial crònica o recurrent, en grau suficient com per a produir expectoració. Les secrecions són presents la majoria de dies durant un mínim de 3 mesos a l'any, durant 2 anys successius, en absència d'altres malalties pulmonars o cardíaques. Existeix una base anatòmica expressada per l'índex de Reid: quocient entre gruix de glàndules i el gruix total de la paret bronquial, que es troba augmentat en els pacients amb bronquitis crònica. Pot haver hipersecreció sense obstrucció al flux aeri (9), com ho

demostren diversos estudis que correlacionen funció pulmonar amb l'índex de Reid(11,12)

La hipersecreció crònica de moc s'associa a un declini del FEV1% (13) i a una taxa de mortalitat augmentada (14).

2.1.3 Agudització de la MPOC

No hi ha una definició universalment acceptada. Siafakas *et al* (9) proposen una definició descriptiva: “deteriorament episòdic i agut, sobreposat a una MPOC estable, caracteritzat per increment de la dispnea, reducció de la capacitat d'activitat diària, amb o sense canvis en el volum d'esput, color d'aquest, tos o febre” .

Les causes són múltiples i sovint multifactorials. En més de la meitat dels casos hi ha una causa infecciosa de la via aèria, mentre que la resta és secundària al d'altres processos. Fins a una 1/3 de les aguditzacions greus no es pot determinar el desencadenant (15). No tots els pacients amb MPOC pateixen el mateix nombre d'aguditzacions, però es desconeixen pel moment quins són els factors que predisposen a les recaigudes. S'ha considerat un component inflamatori sobreafegit, l'adhesivitat bacteriana i possibles defectes immunològics locals, sense arribar a cap conclusió definitiva(16-18)

2.1.4 Colonització

És la persistència d'un bacteri en la pell o mucoses sense produir malaltia clínica o subclínica. El microorganisme obté l'aliment sense produir benefici ni

prejudici a l'hoste; es replica i pot ser identificat per cultiu en el laboratori. La major part de la microflora humana pertany a aquesta categoria. També rep el nom de comensalisme (19).

2.1.5 Portador

Persona colonitzada per un microorganisme, habitualment després d'haver patit una malaltia. Els microorganismes poden cultivar-se en el laboratori. L'estat de portador pot ser transitori, intermitent o crònic. Els factors que influencien el temps de l'estat de portador, no estan ben establerts, però poden representar una immunitat parcial (19).

2.1.6 Infecció

Presència i replicació de microorganismes en els teixits d'un hoste que en provoca una resposta. La resposta de l'hoste a la infecció és variable, provocant una malaltia subclínica o clínica (19).

2.1.7 Malaltia infecciosa

És la infecció que té expressió clínica, amb signes i símptomes. Aquesta apareix quan l'hoste té poca capacitat defensiva, és envaït per múltiples microorganismes o aquests són molt virulents. La gravetat pot ser variable (19).

2.1.8 Malaltia infecciosa subclínica

És la infecció que no té expressió clínica, però si es pot determinar la seva presència a partir de la resposta immunològica (per exemple, quadruplicació del títol d'un agent infectant)(19).

2.1.9 Microflora normal

La flora comensal acull poblacions bacterianes anaeròbiques i aeròbiques, així com alguns fongs, protozous i virus que recobreixen el cos humà en la seva superfície de contacte amb el medi extern, excepte per l'arbre traqueobronquial. La seva relació amb l'hoste, com bé indica el seu nom és de colonització. Per alguns autors (20), el concepte de flora bacteriana normal és estadístic perquè es basa en la immunocompetència de la majoria de la població.

La microflora pot dividir-se en dos grups: a) flora normal resident que és la que es troba regularment i que en cas d'alterar-la es restableix ràpidament, i b) flora transitòria, que pot colonitzar a l'hoste durant períodes variables de temps, però que no s'estableix permanentment (21).

A l'aparell respiratori, en el sentit estricte, sols existeix flora normal en el tracte respiratori superior: foses nasals i faringe. Nogensmenys, aproximadament un 50% de subjectes normals i un 70% de subjectes amb depressió de consciència broncoaspiren durant la nit. Les secrecions orofaríngees contenen al voltant de 10^7 organismes/ml . Així mateix, cada dia

passen per l'arbre respiratori entre 15.000 i 20.000 litres d'aire, que deuen contenir un nombre estimable de microorganismes, una part dels quals arriba - però no colonitza en condicions normals- a la tràquea o arbre bronquial. Els bacteris inhalats són eliminats més ràpidament que els introduïts per aspiració. El dipòsit de 10^6 *Streptococcus pneumoniae* en aerosol no causa malaltia en animals d'experimentació, mentre que 10^3 del mateix organisme produeix pneumònia quan és instil·lat via transtraqueal (22).

És probable que en subjectes sans en situació normal existeixi un trànsit constant de bacteris inhalats i broncoaspirats que són ràpidament eliminats, mantenint una dinàmica esterilitat.

Composició i estructura de la comunitat microbiana:

- **Foses nasals anteriors:** *S.aureus* està present en un 20-30%, en menor proporció *S.epidermidis* i *Corynebacterium*. En la infància és normal la colonització per *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*.

- **Anell de Waldeyer** (Amígdals i adenoides): *Streptococcus viridans*, i en menor quantitat *S.aureus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus parainfluenzae* (i en menor quantitat *Haemophilus influenzae*). Com en la major part de les comunitats microbianes establertes sobre mucoses, en condicions normals, els anaerobis superen en 10 vegades a la flora facultativa.

- **Faringe:** conté gran quantitat de *Streptococcus* del grup *viridans* (*S.mitis*, *S.salivaris*), *S. aureus* i *S.epidermidis*; també *Corynebacterium*, i en el 50% de la població sana s'aïlla *Streptococcus pneumoniae* (amb una freqüència màxima en nens). *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* són també colonitzadors. El grup de les *Neisseria* (*sicca*, *subflava*, *mucosa*, *polysaccharea*, *cinerea* i *flavescens*) forma part habitual de la flora sapròfita. La taxa de portadors de *S.pyogenes* i *N.meningitidis* és baixa (0-15%). Diferents espècies del gènere *Mycoplasma* (excepte *pneumoniae*) poden també trobar-se en aquest territori. La flora anaeròbica manté una composició idèntica a la de l'anell de Waldeyer.

2.1.10 Secreció traqueobronquial

La secreció traqueobronquial és el resultat del moc excretat per les cèl·lules mucoses caliciformes de l'epiteli, les glàndules submucoses i seroses de la via aèria, juntament amb el fluid alveolar (surfactant). S'estima que el volum produït diari és de 10 ml. Existeixen dues capes: una fase sol d'unes 5µm dins la que els cilis bateguen de forma harmònica i metacrònica i per sobre, la fase gel o moc d'un 2 µm amb un moviment anaplèctic, és a dir, que les ones metacròniques van en la direcció contrària al cop efectiu i al moviment de la secreció (23). És probable que les dues fases formin part del mateix procés (exocitosi de mucina)(24).

Les cèl·lules cil·liades es troben fins a la setzena divisió bronquial. Cada una d'elles conté uns 200 cil·lis i nombrosos microvillis. Els cil·lis són projeccions

citoplasmàtiques de les cèl·lules epitelials compostes per dos proteïnes estructurals (la tubulina que forma part dels microtúbuls i l'enzim dineia que s'uneix entre ells). Els cilis poden transportar secrecions contra gravetat i suportar fins a 10 gr/cm^2 sense enlentir el seu moviment. La velocitat a la tràquea varia entre 5-20 cm/min, disminuït progressivament cap a la perifèria del pulmó. En aquesta zona, les secrecions són més aquoses i són reabsorbides. La gran majoria de partícules inhalades són eliminades en unes 6 hores i com a màxim en 24 hores (25).

La quantitat de moc present en la via aèria és el resultat de l'equilibri entre producció i eliminació per via de la reabsorció epitelial, l'evaporació, el transport cil·liar fins a glotis on es degluteixen i finalment la tos, en cas de produir-se.

La seva composició és una complexa mescla amb un 95% d'aigua, proteïnes diverses (3%), sals inorgàniques (1%) i algun lípid (1%). La composició iònica és bàsicament hipotònica (45% menys de Na^+ i Cl^- i 600% més de K^+ que en plasma) . Dins de les proteïnes es troben majoritàriament les glicoproteïnes o mucines (responsables de la viscoelasticitat), lisozima (bactericida per alguns gèrmens), fibronectina (impedeix l'adherència del moc a l'epiteli cil·liar), lactoferrina (bacteriostàtica pels organismes dependents del ferro), Ig A secretora (anticòs principal de la secreció), IgG, transferrina, alfa-1-antitripsina i ceruloplasmina, com les més rellevants.

Les propietats físiques determinen que la secreció tràqueobronquial es catalogui com un gel viscos i elàstic. L'elasticitat és característica pròpia dels sòlids. Aquest fet s'explica en part pels tipus d'enllaços (iònics, covalents, no covalents i del tipus Van der Waals).

La seva funció és triple: 1) aclariment de partícules dipositades en l'interior del tracte respiratori, 2) protecció contra la infecció respiratòria i 3) humidificació de l'aire inspirat i prevenció de la pèrdua excessiva de líquids en la superfície de la via aèria (26).

2.1.11 Esput

Secreció traqueobronquial emesa per la boca amb un cop de tos, que en el seu trànsit per l'orofaringe es mescla amb saliva i cèl·lules descamatives epitelials. L'espú representa un increment de les secrecions normals, i per tant, és un fenomen patològic (27).

2.1.12 Fumador

Subjecte que declara inhalar al menys 1 cigarret de tabac al dia al menys durant 1 mes (28).

2.1.13 Radiologia simple del pacient amb MPOC

Els canvis radiològics solen acompanyar als pacients amb major afectació funcional i clínica. Aquestes són, sintèticament, les característiques més rellevants (29):

- Engruiximent de les parets bronquials: Augment de la trama broncovascular, configurant l'aparença de "pulmó brut".
- Atrapament aeri: visible per augment de la longitud del pulmó, aplanament dels diafragmes i increment de l'espai retrosternal. Anatòmicament correspondria a emfisema centrelobulillar, amb predomini als lòbuls superiors.
- Oligèmia: disminució del calibre dels vasos pulmonars, amb ràpid aprimament en els trams distals. Té correlació amb les àrees de destrucció parenquimatososa (emfisema).

És possible que dins els canvis crònics característics de la radiologia simple, puguin albergar-se petites bronquièctasi sols detectables per TAC d'alta resolució. El seu significatiu clínic últim està encara per a determinar, però podria representar un factor de risc per a estar colonitzat.

2.2 MÈTODES DIAGNÒSTICS D'INFECCIÓ BRONQUIAL

A continuació s'expressen els mètodes utilitzats per a l'obtenció de material per a l'estudi microbiològic de les infeccions estrictament bronquials.

2.2.1 Espot

A. Mètode:

Aconseguir expectoració el més pura possible, sense material de la nasofaringe ni saliva, dins d'un recipient estèril i amb tancament hermètic. En cas de no expectorar, pot aconseguir-se de forma induïda a partir de la inhalació de sèrum hipertònic (3-10%) nebulitzat. Cal processar-lo abans de 5 hores per a evitar sobrecreixement de la flora comensal en detriment de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* i bacil gram negatiu. Pels organismes no colonitzadors (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Nocardia asteroides*), la seva presència en les diferents tècniques d'identificació és sinònim de positivitat i indica, per tant, infecció. En la resta de microorganismes caldrà que es compleixin una sèrie de requisits en la qualitat de l'esput i en les característiques del creixement bacterià. Tots aquests procediments es realitzaran en el laboratori de Microbiologia i sintèticament s'expressen a continuació els més rellevants.

- Rentats amb sèrum fisiològic per tal d'eliminar el màxim la saliva acompanyant i la població comensal que conté. En un estudi de Bartlett i

Finogold (30), s'observa com les mostres d'esput amb concentracions de contaminants superiors a 10^6 UFC/ml passaven del 70% al 26% quan es procedia a rentar l'esput.

- Classificació citològica en funció de les cèlul.les escamoses de l'epiteli de la boca, neutròfils i marcofàgs alveolars. Les classificacions de Bartlett (31), Heineman *et al* (32) i Baigelman (33) han estat superades per la de Murray i Washington (34). En els seu article, estableixen una classificació dels esputs en 5 categories, i en comparen els resultats microbiològics amb els d'uns ATT (aspirats transtraqueals), considerant els aspirats transtraqueals com la mostra de referència a l'estar lliure de contaminació orofaríngia. El Grup 1 representa el menys pur mentre que el grup 5 és considerat el més representatiu.

Taula 2. Classificació de Murray-Washington

Grup	Cèl. Epiteliales	Leucòcits
1	>25	<10
2	>25	10-25
3	>25	>25
4	10-25	>25
5	<10	>25
ATT

ATT: aspirats transtraqueal

Els autors conclouen que només són susceptibles de ser cultivats els esputs de grau 5. En aquest article no s'especifiquen les característiques clíniques dels pacients (MPOC, bronquitis crònics, tabaquisme, estabre, infecció

aguda...), ni tampoc els ATT practicats són dels mateixos pacients. En l'anàlisi dels gèrmens aïllats s'observa com la classificació citològica permet reduir alguns gèrmens, mentre que d'altres es mantenen pràcticament sense alterar-se.

Taula 3. Aïllaments bacterians del Grup 1 i Grup 5 de Murray-Washington, i dels aspirats transtraqueals (ATT)

Gèrmens	Grup 1 (%)	Grup 5 (%)	ATT(%)
<i>S. viridans</i>	93	44	28
<i>S. epidermidis</i>	80	35	15
<i>Neisseria</i>	89	33	19
<i>Haemophilus</i>	65	27	15
Fongs	28	16	26
<i>Corynebacterium</i>	9	8	9
<i>S. pneumoniae</i>	0	6	4
<i>S. aureus</i>	6	14	11
<i>Moraxella</i>	4	3	2
<i>P. aeruginosa</i>	13	21	15

En una recent editorial (35) de Chest, S. Chodosh afirma que malgrat els criteris de Murray-Washington han millorat significativament la fiabilitat de les tincions de Gram dels esputs, sols han millorat de forma marginal els cultius dels mateixos.

Estudis quantitius: Bartlett i Finegold determinaren que els gèrmens potencialment patògens es trobaven en concentracions de $10^{6.6}$ UFC/ml. Aquest punt de tall també s'ha utilitzat en estudis més recents (36)

B. Avantatges:

Mètode no invasiu, i el més natural, per a l'obtenció de material procedent de les vies aèries. El material, encara que de volum variable, sol ser representatiu d'extenses àrees de l'arbre traqueobronquial. Té baix cost, doncs no es precisa d'instrumentació especial. Permet *altres* estudis apart de l'estrictament microbiològica (marcadors d'inflamació, citologia...) (37). No es dilueix en sèrum fisiològic, com el raspall protegit o la RBA . Permet múltiples mostres en el mateix subjecte, tant en fase estable com en aguditzada.

C. Desavantatges:

No és factible en persones incapaces d'expectorar (nens, pacients molt debilitats...), o pot ser difícil d'obtenir en el moment en què es precisa. Per definició, presenten contaminació de la flora comensal de l'orofaringe. S'ignora el temps durant el qual l'expectoració ha romàs dins de la via aèria i la seva repercussió clínica.

D. Resultats en la MPOC i BC aguditzada i l'estable

A continuació s'expressen en 2 taules el articles més significatius que proporcionen informació sobre els cultius en fase estable i aguditzada. Per a la MPOC aguditzada s'han emprat els següents articles: Miravittles *et al* (36), Smith *et al* (38), Viejo *et al* (39), Davies *et al* (40), Eller *et al* (41).

Taula 4 . Cultius d'esput en la MPOC aguditzada

Article	Nº aïllaments /Nº esputs	Classificació	Cultiu Quantitatiu	Resultats
Miravittles <i>et al</i>	91/91	M-W 5	Si + > 10 ⁶ (10 ⁵ per SP)	HI 20/ SP 9/ MC 8/PA 14 Bgn 7/MnPP 33
Smith <i>et al</i>	37/34	-	-	HI 16/SP 6/PA 5/MC 4/ bgn 5/ SA 1
Viejo <i>et al</i>	93/70	M-W 5	Si (no especificat el punt de tall)	HI 22/SP 11/ MC 6/PA 5/bgn 5/MnPP 31/altres 13
Davies <i>et al</i>	578/500	-	-	HI 190/MC 157/SP 154/PA 14/ SA 7/altres 56
Eller <i>et al</i>	112/112	M-W 5	-	SP 19/HI 16/SA 15/MC 8/PA 14/ bgn 40
TOTAL	911/807			264(29)HI/199(22)SP/183(20)MC/PA52(5,7)/ bgn57(6,2)/SA23(2,5)/MnPP 64 (7) i altres 69 (7,5)
HI: <i>H. influenzae</i> , SP: <i>S. pneumoniae</i> , MC: <i>M.catarrhalis</i> , PA: <i>P.aeruginosa</i> , SA: <i>S.aureus</i> , bgn: bacils gram negatius				

En la següent taula s'expressen els resultats microbiològics dels articles que han emprat l'esput en pacients amb bronquitis crònica estable.

Taula 5. Cultius d'esput en la Bronquitis Crònics estable

Referència	N	Clínica	Classificació	Cultiu Quantitatiu	Resultats
Stuart-Harris	86/172	BC	No	No	SP 50/ HI 15/SA 11/bgn5 <i>S.haemolyticus</i> 5(86)
Brown	172/83	BC	No	No	SP 73/HI 50/ <i>S.haemolyticus</i> 25/ SA 10/ bgn 14 (172)
May	108/54	BC	No	No	SP 57/HI 25/ SA 13/ bgn 13 (108)
Miller	119/110	BC	No	No	SP 35/HI 40/ <i>S.haemolyticus</i> 32/ SA 5/ bgn 7 (119)
Rosell	18/10	MPOC	M-W 5	No	HI 5/SP 1/MC 5/12 flora comensal
TOTAL	485/419	215SP/130HI/SA39/bng39/altres62			
HI: <i>H. influenzae</i> , SP: <i>S. pneumoniae</i> , MC: <i>M.catarhalis</i> , PA: <i>P.aeruginosa</i> , SA: <i>S.aureus</i> , bgn: bacils gram negatius					

Referències: Stuart-Harris(42), Brown(43), May(44) Miller *et al.*(45)

2.2.2 Punció transtraqueal

A. Mètode:

La tècnica fou descrita a finals de la dècada del 50' (46), i després del seu auge en els 70', actualment s'utilitza sols aïlladament al Japó (47-49). Aquest declini s'ha produït per la seva dubtosa relació risc-benefici juntament amb l'avenç de la broncoscòpia flexible i les seves tècniques acompanyants.

En breu, el pacient ha d'estar en supí i el coll en hiperextensió. La membrana intercricotoïdal es palpa i s'infiltra amb lidocaïna al 2% i adrenalina. Es punxiona amb una agulla de 14G i es fa passar un catèter, retirant l'agulla

un cop s´hagi guanyat l'espai traqueal. S'introdueix el catèter uns 20 cm i es procedeix a aspirar amb una xeringa de 20 cc amb una clau Luer o bé directament amb una aspiració en Y i un tub de Luken. S´ha d'intentar no instil·lar sèrum per tal de no diluir la mostra.

B. Avantatges:

No hi ha contacte amb orofaringe durant el procediment. Irwin *et al* (50) practiquen aspirats transtraqueals en 20 pacients amb MPOC estable ,havent prèviament nebulitzat l'orofaringe amb blau de metile i amb control citològic de les mostres, i no n'obtenen cap de contaminada. En canvi, en el context de pneumònia té un 1% de falsos negatius i un 21% de falsos positius (51). El material, encara que de volum variable, sol ser representatiu d'extenses àrees de l'arbre traqueobronquial. No es dilueix, en principi, en sèrum fisiològic com el raspall protegit o el RBA. El cost és menor que una broncoscòpia flexible.

C. Desavantatges:

Mètode invasiu que precisa d'instrumentació. S´ha descrit complicacions diverses: en el lloc de punció (sagnat, punció paret posterior tràquea, abscessos, emfisema subcutani...), per introducció del catèter d'aspiració (hipoxèmia, arritmies, isquèmia miocàrdica...) i sovint síndromes vasovagals. Fins i tot s´ha registrat morts relacionades amb el procediment (52). Cal respectar les contraindicacions (hemoptisi, diàtesi hemorràgica, hipoxèmia, pacients perdiàtrics, impossibilitat d'hiperextensió del coll...) És precisa de

certa experiència i capacitat per a resoldre les complicacions. Quan la mostra no és abundant s'ha de recórrer a instil·lar sèrum fisiològic, diluint-la. És una mostra a cegues.

D. Resultats en la MPOC estable i aguditzada

S'ha utilitzat les següents referències, Bartlett (51), Haas (55), Irwin (50) i Bjerkestrand *et al* (56).

Taula 6. Aspirats transtraqueals en la MPOC estable i aguditzada

<i>Article</i>	<i>N</i>	<i>Clínica</i>	<i>Cultius positius</i>
<i>Bartlett</i>	16	<i>MPOC aguditzada</i>	100%
<i>Haas</i>	24	<i>MPOC aguditzada</i>	21 (87%)
<i>Irwin</i>	10/20 12 aïllaments	MPOC estable	SV6/HI2/SP1/NM2/C1
<i>Bjerkestrand</i>	26	<i>MPOC estable</i>	85%

SV: *S. viridans*, HI: *H. influenzae*, SP: *S. pneumoniae*, NM: *N. Meningitidis*,

C: *Corynebacterium*

2.2.3 Immunologia

Els mètodes amb base immunològica s'utilitzen en l'actualitat bàsicament per a determinar el paper etiològic de gèrmens no colonitzadors de l'orofaringe en estudis de recerca de la MPOC aguditzada . Respecte els gèrmens colonitzadors potencialment patògens, s'establiren en investigacions dels anys 60, les següents conclusions: que els pacients amb bronquitis crònica

tenen més freqüentment anticossos sèrics contra *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae* que la població normal, que no hi ha un increment dels títols d'anticossos contra *Haemophilus influenzae* en les aguditzacions i que aquests resulten invariables malgrat tractament antibiòtic (57).

A continuació es descriuen els mètodes utilitzats per aquest grup de patògens no colonitzadors habituals de l'orofaringe:

- *Mycoplasma pneumoniae* :

Determinació per medi de fixació del complement d'anticossos sèrics en fase aguda i fase de convalescència. La seva quadruplicació serà diagnòstica, així com un títol de 1:128 en la fixació del complement. Una altra forma és la detecció per enzim immuno assaig en fase sòlida o ELISA (enzym-linked immunoabsorbent assay) ja sigui amb gèrmens lisats o bé amb la proteïna d'adhesió P1 purificada. La presència de crioaglutines a 1:32 és també diagnòstica.

- *Chlamydia pneumoniae* :

El mètode emprat habitualment és la determinació d'anticossos per immunofluorescència indirecta, amb seroconversió per quadruplicació del títol inicial, Ig G 1: 1024(58) o un títol d' Ig M 1: 32. Pot cultivar-se en medi cel·lular i tècniques d'ampliació genètica (seqüències del gen que codifica l'ARN ribosomal 16S-16S ARNr-, i d'un element de 474 pb resultant de la restricció amb PstI)

- *Legionella pneumophila*:

Diverses tècniques són recomanades: la detecció d'anticossos per medi d'immunodeficiència indirecta en sèrum de fase aguda i convalescent amb seroconversió assolint un títol de 1:128, un únic títol en la fase aguda en la concentració de 1:128 o la detecció d'un antigen soluble en orina via aglutinació amb làtex, radioimmunoassaig o ELISA. Actualment també és possible la determinació a partir de l'ampliació gènica (seqüències del gen mip, de l'element REP i del gen codificant de l'ARN ribosomal 5S). Amb tot, el mètode definitiu de diagnòstic és el cultiu en agar modificat.

- *Virus respiratoris (influenza, parainfluenza, adenovirus virus sincitial respiratori, rinovirus i coronavirus)*

Es precisa una seroconversió de negatiu a positiu o bé quadruplicar el títol de la fase aguda a fase de convalescència, per medi de la fixació del complement i ELISA. És possible detectar tots els virus amb tropisme per l'epiteli respiratori pels rentats nasofaringis o frotis faringi. Els cultius tenen un cost elevat i tarden una setmana pel virus influenza i dos per la resta de virus. És per això que s'ha desenvolupat tècniques més ràpides i econòmiques. La detecció d'antígens vírics és possible en les secrecions respiratòries a partir d'immunofluorescència, assaig en fase sòlida o per hibridació marcada d'àcids nucleics del virus. Pel diagnòstic del citomegalovirus (CMV) s'ha utilitzat anticossos monoclonals. A excepció dels adenovirus, herpes virus i CMV, que poden estar presents també en controls sans, la positivitat per aquests medis

és diagnòstica. El virus sincitial respiratori pot ser aïllat mesos després de la infecció aguda. Aquestes tècniques tenen una especificitat superior al 95% però amb una sensibilitat variable.

EL diagnòstic histològic és menys sensible que el cultiu, ja que s'examina una porció petita. La diferenciació entre les inclusions víriques no sempre és definitiva, per exemple, entre les inclusions intranuclears d'herpes virus i adenovirus.

2.2.4. Tècniques broncoscòpiques

Amb l'objectiu de sobrepassar la contaminació orofaríngia alguns autors havien utilitzat sondes estèrils a través del broncoscopi rígid. Una de les últimes publicacions correspon a la de Gardiner *et al* (59). En 34 pacients amb bronquitis crònica obté anaerobis (no especificats) en: 2 pacients amb $> 10^7$ org/ml, 2 més amb 10^2 - 10^5 org/ml (total 11,7%); i aerobis (no especificats) en 15 pacients (44%). La resta dels cultius foren negatius.

Amb la introducció de la broncoscòpia flexible a la meitat dels anys setanta, s'incorporen noves tècniques diagnòstiques com són els broncoaspirats, el rentat broncoalveolar i el raspall protegit. Els aspirats a través del broncoscopi no demostraren des del principi cap benefici sobre els aspirats transtraqueals (60) (61) i no s'han utilitzat més en l'estudi bacteriològic convencional dels pacients amb MPOC. A continuació es descriuen les característiques més rellevants del rentat broncoalveolar i del raspall protegit.

Rentada broncoalveolar (RBA):

A.Tècnica:

Un cop el broncoscopi flexible s'ha enclavat en un bronqui segmentari o subsegmentari, s'instil·la a través del canal de treball sense haver aspirat o haver instil·lat anestèsic local, un total de 150 cc de sèrum fisiològic al 0,9% o Ringer Lactat en xeringues de 20 o 50 cc. Després de cada xeringa s'aspira recuperant parcialment del líquid introduït. En condicions normals es recupera un 50% del total instil·lat. La primera fracció es considera la bronquial al contactar bàsicament amb trajecte bronquial, mentre que les dues últimes arriben a l'espai alveolar .

El RBA s'utilitza habitualment per a descartar infeccions oportunistes, càncer de pulmó no central i malalties intersticials.

B. Avantatges:

Aconsegueix contactar una ampla zona pulmonar, encara que fora de les vies respiratòries principals, a no ser que sols s'utilitzi la primera alíquota (62). Uns 100 ml de rentat cobreix uns 10^6 àlveols. La recuperació d'abundant component cel·lular permet realitzar estudis citològics, bioquímics i immunològics . Disminueix parcialment la contaminació de l'orofaringe, sobretot si la interpretació es fa en base a un punt de tall d'UFC/ml.

C.Desavantatges:

La pròpia pràctica de la broncoscòpia flexible, amb totes les seves contraindicacions i taxa de morbimortalitat associada. Imputable directament la

RBA es descriuen: Febre i escalfreds (2-20%), pneumonitis (< 1%), broncoespasme, pneumotòrax i hipoxèmia (63). Durant la instrumentació en les vies aèries superiors la contaminació és indefugible, com ho demostren diversos estudis en subjectes sans (60,64) (65) . Un mètode per a descartar els gèrmens contaminants o els colonitzadors dels patògens, en el context del diagnòstic de pneumònia bacteriana , és quantificar el nombre d'unitats formadores de colònies per mil·lilitre. Els gèrmens contaminants es troben en concentracions baixes i els infectants en concentracions altes (66,67). La mostra de la RBA està diluïda aproximadament en la proporció de 1 ml de secreció traqueobronquial en 10-100 ml de sèrum fisiològic (factor de dilució 1/10-1/100) i cal establir un punt de tall que reverteixi aquest efecte i iguali la concentració de 10^5 - 10^6 UFC/ml que s'ha demostrat identifica correctament els espuds de pacients amb pneumònia (30). Donat que el factor de dil.lució per espuds és nul, el punt de tall per la RBA hauria de ser 10^4 UFC/ml. En els estudis abans mencionats en subjectes sans (66,67), la majoria de mostres obtenen gèrmens no potencialment patògens a concentracions < 10^5 UFC/ml. En alguns estudis, encara que en el particular escenari dels pacients ventilats mecànicament, aquesta diferenciació no és fiable en la seva totalitat. Chastre *et al* (68) evidencien que un 31% dels pacients ventilats mecànicament sense pneumònia tenien > 10^4 UFC/ml i en 3 pacients amb pneumònia sobre un total de 5, presentaven concetracions de gèrmens inferiors al punt de tall establert. El punt de tall no és, doncs absolutament descriminatiu i s'ha aboga per afegir altres tipus de control. L'estudi citològic, dirigit a detectar la presència cèl·lules

epitelials de la cavitat orofaríngia i de polimorfonuclears provinents de la infecció pulmonar, és necessari per alguns autors (69). Aquests autors troben en subjectes normals cultius amb $> 10^4$ UFC/ml i $> 1\%$ cèl·lules de la cavitat oral, resultant d'un evident contaminació. Una altra forma d'obviar la contaminació orofaríngia és obtenir el líquid de la RBA a través d'un catèter amb oclusió distal i baló inflable en el seu extrem, és el denominat RBA protegida proposat per Meduri (70). Aquesta tècnica s'ha utilitzat exclusivament en les pneumònies de pacient ventilats mecànicament i no s'ha emprat en pacients amb MPOC. Per tant, la RBA no pot establir-se com el mètode diagnòstic definitiu per la pneumònia bacteriana en el pacient immunocompetent. La seva aplicació per l'estudi de la població bacteriana endobronquial resultarà afectada per el mateix tipus de limitacions.

Altres desavantatges són que la tècnica és difícilment repetible en el pacient no ventilat i el seu cost és elevat.

D. Resultats en la MPOC aguditzada i estable

Per a la confecció de la següent taula-resum s'ha emprat les següents referències: Cabello *et al* (65), Soler *et al* (71), Pang *et al* (72).

Taula 7. La rentada bronco-alveolar en la MPOC (estable i aguditzada)

Referència	N	Clínica	Punt de tall	Resultats (%)

<i>Cabello et al</i>	2/16	MPOC estable	10 ⁴ UFC/ml	<i>S. viridans</i> 50% <i>S.pneumoniae</i> 50%
<i>Soler et al</i>	26/41 (43 aïllaments)	MPOC aguditzada, pacients intubats	10 ³ UFC/ml	SP 15/ HI 19/MC 11 PA 15/ bgn 15/MnPP 46
<i>Pang et al</i>	14/21 (20 aïllaments)	Bronquièctasi (no fibrosi quística) estables	10 ⁴ UFC/ml	HI 30/PA 20/SA 15/ K ozaenae 10/P fluoresecens 10/SP 5/Acaligenes spp 5/ S no hemolític 5

Raspall protegit

A. Evolució històrica

Els primers intents d'obtenir mostra per a cultiu amb un raspall foren en els anys seixanta a través d'un broncoscopi rigid (73). Amb la introducció del broncofibroscopi a principis del setanta, s'idearen mètodes per a obtenir secrecions traqueobronquials. Wanner *et al* (74) descriviren una tècnica que consistia en passar a través del canal de treball del fibrobroncoscopi una llaçada metàl·lica estèril dins d'un catèter, sense l'extrem del mateix ocluit o protegit. Els cultius no es quantificaren. Wimberley i col·laboradors (75) descriuen un sistema en el que un raspall estèril es protegia dins de dos catèters telescopats. L'extrem distal del catèter extern es trobava ocluit per un tap de polietilenglicol, que un cop expulsat dins de l'arbre bronquial es reabsorbia. Un cop s'aconseguia la mostra, el raspall es recol·locava dins dels catèters i un cop a fora es tallava la porció distal del raspall i es dipositava en 1 ml de sèrum fisiològic o Ringer lactat. Hayes *et al* (76) compararen aquest nou mètode amb

la tècnica descrita anteriorment per Wanner *et al.* Hayes demostra que el mètode descrit per Wanner no evitava la contaminació de la flora orofaríngia (cultius amb flora comensal en més del 50% de les mostres), mentre que el mètode del raspall protegit proposat per Wimberley estava exempt de contaminació en els 10 subjectes examinats. Poc després, aparegueren 2 publicacions més que utilitzen també un raspall no ocluit. Teague *et al* (77) el 1981, a banda de quantificar els cultius i establir un punt de tall de 10^6 UFC/ml, apliquen un control citològic amb tinció de Gram i Giemsa. Els resultats que aporten són els següents: tots els infectats presenten Gram positiu i leucòcits en la tinció de Giemsa essent els cultius tots positius pel punt de tall proposat; en el grup control no s'observen gèrmens en el Gram i els cultius positius ho són per sota de 10^4 UFC/ml. Winterbauer *et al* (78) el 1983, també quantifiquen els cultius, amb un punt de tall de 10^4 UFC/raspall. Detecten, així mateix, els anticossos adherits als bacteris per medi de fluorescència directa, tècnica importada dels estudis sobre infecció urinària, com a element diferenciador de la infecció sobre la colonització. El 87% dels infectats presentaven cultius positius i un 72% bacteris adherits. En el grup control cap cultiu superava el punt de tall i sols en 1 sobre 60 subjectes es detectaven bacteris adherits.

Per les mateixes dates ja es publiquen els primers estudis utilitzant la tècnica del raspall protegit(79,80) (81) (82) i ja sols apareixeran aïllades publicacions amb raspall no protegit. La més recent correspon a la de Dilworth *et al* (83) en la que estudien la població bacteriana endotraqueal en el moment

de la intubació en 24 pacients sotmesos a cirurgia abdominal alta. Cap d'ells no s'especifica si és bronquític crònic ni si està afectada de MPOC. Els cultius no es quantifiquen. Donat que sols centren el seu estudi a nivell traqueal en el moment immediatament després de la intubació, i el procediment es fa a cegues sense control endoscòpic, l'extrapolació dels seus resultats és més que dubtosa. Els seus resultats mostren cultius positius per *Haemophilus influenzae* en 5 (20%), tots ells acompanyats de flora comensal orofaríngia, bacils entèrics gram negatius 1 (4%), també acompanyats de flora comensal, i en 8 (33%), flora comensal. La resta (37,5%) els cultius són negatius.

En la primera publicació clínica rellevant aplicant el raspall protegit i desenvolupada pel mateix equip (79) en la que s'exploren un total de 65 pacients, s'observa que els pacients amb patologia pulmonar infecciosa (pneumònia bacterièmica, abscess pulmonar i pneumònia necrotitzant) presentaven unes concentracions de gèrmens superiors a 10^3 UFC/m (i en el grup de les pneumònies bacterièmiques els gèrmens eren coincidents), mentre que els no afectes d'un procés infecciós o bé que havien rebut antibiòtics, el creixement era inferior a 10^3 UFC/m. A partir d'aquesta publicació es considerà aquest punt de tall com a diferenciador entre infecció aguda bacteriana i colonitzadors.

La primera menció en la literatura en que es cultiva pacients amb bronquítis crònica aguditzada (no s'especifica funció pulmonar), és ja en el mateix 1982. Pollock *et al.* estudien 78 pacients amb pneumònia i 11 amb exacerbació de la bronquítis crònica. EL 100% dels mateixos mostren un

creixement bacterià amb concentracions 10^3 UFC/ml al menys en un dels gèrmens del cultiu. Cinc pacients (45%) presentaven cultius polimicrobians. Els resultats expressats són: *Haemophilus influenzae* 8 (72%), quatre d'ells amb flora mixta, *Pseudomonas aeruginosa* 2 (18%) i *Streptococcus pneumoniae* 1 (9%) juntament amb flora mixta. Donats els resultats, els autors no poden especular sobre el significat de concentracions baixes o cultius negatius del raspall protegit en la bronquitis crònica exacerbada, ni tampoc el paper dels gèrmens no potencialment patògens.

El primer article publicat en que s'aplica el raspall protegit en pacients amb bronquitis crònica (no s'especifica si amb MPOC) clínicament estable data de 1986 (84). Són 18 pacients als que es practica una broncofibroscòpia per sospita de neoplàsia broncogènica. En tots els subjectes s'obtenen 2 mostres del pulmó contralateral a l'opacitat radiològica: una per a cultiu convencional amb quantificació en forma d'UFC/raspall i una segona mostra en una extensió per a detecció de bacteris recoberts d'anticossos per medi d'immuno-fluorescència (positiu si s'observaven al menys 5 bacteris recoberts en un camp d'alta resolució). EL 100% dels subjectes presentaven creixements bacterians: *Streptococcus pneumoniae* 9 (50%), *Staphylococcus aureus* 5 (27%), *Haemophilus influenzae* 4 (22%) i *Pseudomonas aeruginosa* 1 (5%), i un cultiu era polimicrobià. Les concentracions varien de 10^1 a 10^4 UFC/raspall, essent 6 (30%) d'elles 10^3 UFC/raspall. Totes les mostres excepte 1 presentaven gèrmens recoberts per anticossos. La discussió de l'article se centra en el significat de la positivitat dels gèrmens recoberts i sols menciona de forma

somera que sols 1 pacient obté un creixement 10^4 UFC/ml, sense interpretar els 5 pacients amb 10^5 UFC/ml.

Pang i col·laboradors (72) cultiven l'arbre bronquial amb el raspall protegit i una RBA en 22 pacients amb bronquièctasi no associades a fibrosi quística i en situació clínica estable. Per cada tipus de mostra utilitzen un fibrobroncoscopi, a través d'un tub orotraqueal. No s'especifica la funció pulmonar dels mateixos. La publicació, que data de 1989, aporta les següents dades: 13 pacients presenten creixement bacterià amb un punt de tall de 10^3 UFC/ml, detectant 3 creixements polimicrobians. Els gèrmens detallats són: *Haemophilus influenzae* 5 (29%), *Pseudomonas aeruginosa* 4 (24%), *Kebsiella ozaenae* 2 (12%), *Staphylococcus aureus* 2 (12%) *Pseudomonas fluorescens* 1 (6%) *Streptococcus pneumoniae* 1 (6%) *Staphylococcus coagulasa* negatiu 1 (6%) *Veillonella* spp 1 (6%). Les combinacions polimicrobianes són: *Streptococcus pneumoniae* + *Haemophilus influenzae* , *Pseudomonas aeruginosa* + *Veillonella* spp i *Staphylococcus aureus* + *Haemophilus influenzae* + *Kebsiella ozaenae*.

És en el 1990 en que es publica el primer estudi en que els pacients presenten una agudització greu que obliga a ventilació mecànica per insuficiència respiratòria hipercàpnica. No s'especifica la funció pulmonar dels mateixos, però a jutjar per la gravetat de l'exacerbació, és presumible que tots ells estiguessin afectes de MPOC. Dels 54 pacients cultivats, 27 (50%) presenten creixements bacterians en diferents concentracions (44% amb 10^3

UFC/ml). S'aïllen un total de 44 gèrmens: *Haemophilus parainfluenzae* 11 (25%), *Streptococcus pneumoniae* 7 (16%), *Haemophilus influenzae* 6 (14%), *Staphylococcus aureus* 4 (9%), *Moraxella catarrhalis* 3 (7%), *Pseudomonas aeruginosa* 3 (7%), *Proteus mirabilis* 3 (7%), *Escherichia coli* 2 (4%), *Corynebacterium* spp 1 (2%), altres estreptococs 4 (9%). Els autors consideren tots els creixements com a patològics, independentment de la seva concentració o potencialitat patogènica.

La primera investigació del patró bacterià endobronquial en pacients amb MPOC la duren a terme Riise *et al* (85) el 1994. En aquest treball comparen els cultius d'un grup control format per 14 subjectes, 22 fumadors amb bronquitis crònica no obstructiva i 19 pacients fumadors amb bronquitis crònica i MPOC, tots ells clínicament estables. S'estableix el punt de tall a 10^3 UFC/ml. EL nombre d'aïllaments positius per cada grup són els següents: 0 en sans, 6 en el grup de bronquitis crònica simple i 12 en els pacients amb MPOC de grau moderat (FEV1% 62 ± 2). Es contabilitzen 8 pacients amb més d'un germen a concentracions significatives, però no s'especifica en el text quines són les combinacions ni a quin grup corresponen. Els resultats globals per gèrmens són els següents: Estreptococ alfa-hemolític 7 (38%), bacils difteroides 3 (16%), estafilococ coagulasa negatiu 2 (11%), *Haemophilus influenzae* 1 (5%), *Streptococcus pneumoniae* 1 (5%) i altres-*Haemophilus parainfluenzae*, estreptococ β tipus B, *Neisseria* spp. 4 (22%).

Martinez *et al* (86) de l'Hospital de l'Esperit Sant de Santa Coloma de Gramanet publiquen en el 1994 una segona sèrie de pacients ambulatoris amb bronquitis crònica aguditzada que consulten a urgències. No s'especifica la funció pulmonar dels pacients. En 18 dels 20 (90%) dels pacients estudiats s'obté algun tipus de creixement bacterià en diferents concentracions. En total 41 aïllaments, 10 polimicrobians. S'estableix la divisió entre gèrmens en 10^3 UFC/ml i aquells amb menor concentració. Alhora també divideixen els gèrmens entre potencialment patogènics i d'aquells que habitualment no s'hi consideren. Els resultats globals són: *Streptococcus pneumoniae* 9 (21%), *Haemophilus influenzae* 5 (12%), *Moraxella catarrhalis* 3 (7%), *Pseudomonas aeruginosa* 1 (2,4%), *Neisseria meningitidis* 1 (2,4%) i el grup de potencialment no patogènics: *Streptococcus viridans* 12 (29%), *Neisseria spp* 5 (12%), difteroides 2 (4,8%), *Staphylococcus coagulasa negatiu* 1 (2,4%), *Streptococcus agalactiae* 1 (2,4%) i *Pasteurella multocida* 1 (2,4%). En 18 (43%) aïllaments de gèrmens potencialment patògens, la concentració era 10^3 UFC/ml. En 19 (46%) dels aïllaments de gèrmens no potencialment patògens, la concentració també era 10^3 UFC/ml.

El nostre grup és el que per primera vegada practica el mateix procediment diagnòstic en dos poblacions de pacients ambulatoris amb MPOC, estable i aguditzada, sense diferències significatives en la seva funció pulmonar ni les dades antropomètriques bàsiques(2) . Aquest article és un dels dos que forma part del cos de la tesi (veure apartat 4).

EL següent article rellevant es publica el 1997 produït pel Servei de Pneumologia de l'Hospital Clínic de Barcelona (65). En aquest ampli estudi s'investiga la colonització bronquial de 116 pacients ambulatoris a partir del raspall protegit i RBA, tal com Pang *et al* (72) havien realitzat en un reduït grup de pacients amb bronquièctasi. Aquesta és la sèrie més llarga encara publicada. El subjectes estudiats inclouen 16 sans, 33 amb neoplàsia broncogènica, 18 amb MPOC (13 lleus i 5 moderats), 17 amb bronquièctasi i 32 amb traqueostomia. A diferència de la resta de treballs publicats s'estableix el punt de tall a 10^2 UFC/ml pel raspall protegit i a 10^3 UFC/ml per la RBA i s'estableix una diferenciació entre MPP i els MnPP alhora d'expressar els resultats i la consegüent interpretació. S'utilitza el mateix fibrobroncoscopi per a l'obtenció del raspall protegit i la RBA, a diferència de Pang *et al*. La primera fracció del RBA es desestima, al contrari de Pang *et al*. En els subjectes sans es descruïuen dos amb colonització significativa, un amb MPP (*Staphylococcus aureus*) i un altre subjecte amb dos MnPP (grup *Streptococcus viridans*, *Streptococcus* grup D, no enterococ); 3 més presenten concentracions per sota del punt de tall establert. En el grup dels pacients amb MPOC s'objectivitza: 2 cultius estèrils, 1 per sota el punt de tall i 15 (83%) amb creixement significatiu amb un total de 27 aïllaments. De forma detallada: 11 (41%) del grup *Streptococcus viridans*, 6 (22%) *Neisseria* spp, 2 (7%) *Streptococcus pneumoniae*, 2 (7%) estafilococ plasmacoagulasa negatiu, 2 (7%) *Haemophilus influenzae*, 2 (7%) *Corynebacterium* spp., 1 (4%) *Staphylococcus aureus* i 1 (4%) *Candida* spp.

L'article publicat per Zalacaín *et al* (87) de l'Hospital de Cruces de Barakaldo en el mateix 1997, també compara dos grups reduïts de pacients amb MPOC. Catorze en fase estable i 12 aguditzats. A diferència del nostre treball, el grau d'obstrucció de tots ells era greu (FEV1 % < 50%). El punt de tall s'estableix en 10^3 UFC/ml. En 8 pacients estables (57%) s'obtenen 9 aïllaments: *Haemophilus influenzae* 4, *Moraxella catarrhalis* 1, *Escherichia coli* 1 i *Streptococcus viridans* 3; 1 cultiu polimicrobià (*Haemophilus influenzae* + *Streptococcus viridans*) . En un pacient s'obtingueren 10^2 UFC/ml de *Neisseria* spp i els 5 restants foren cultius estèrils. En el grup dels aguditzats es computen també 9 aïllaments en 8 pacients (66%): *Haemophilus influenzae* 4, *Klebsiella pneumoniae* 1, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Acinetobacter calcoaceticus* 1, *Neisseria meningitidis* 1 i *Streptococcus viridans* 1. El cultiu polimicrobià corresponia a *Haemophilus influenzae* + *Streptococcus viridans*. Un pacient es registrà 10^2 UFC/ml de *Neisseria* spp. i en un altre 10^1 UFC/ml de *Corynebacterium* spp; la resta foren estèrils.

L'any següent, es publica un altre exhaustiu i complet estudi dut a terme pel grup de l'Hospital Clínic de Barcelona , en 50 pacients amb MPOC aguditzats que requereixen ventilació mecànica. A banda del raspall protegit, es practica RBA i serologies per a virus i gèrmens atípics (*Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* i *Coxiella burnetii*). Aquest és l'únic treball que combina raspall protegit i serologies en una agudització de pacients amb MPOC. S'utilitza el mateix fibrobroncoscopi per a l'obtenció del raspall protegit i la RBA. La primera fracció de la RBA es desestima. Els punts

de tall segueixen essent els mateixos que en la seva anterior publicació. El grau d'obstrucció, de les 43 espirometries obtingudes, mostra un esperable predomini dels greus (27), però també es comptabilitzen 10 moderats i 6 lleus. Per sobre del punt de tall es detecten 26 aïllaments (3 polimicrobians) de MPP i 11 aïllaments (3 polimicrobians) de MnPP. En el primer cas representa un 46% de la mostra (23/50) i pels MnPP un 16% (8/50). Els aïllaments de MPP per sobre el punt de tall són: *Streptococcus pneumoniae* 4 (15%), *Haemophilus influenzae* 10 (38%), *Moraxella catarrhalis* 4 (15%), *Enterobacter cloacae* 1 (3,8%), *Pseudomonas* spp. 5 (19%), *Stenotrophomonas maltophilia* 2 (7,6%). Per sota de 10^2 UFC/ml es troben: *Haemophilus influenzae* 1 i *Enterobacter cloacae* 1. Quant als MnPP en el grup de 10^2 UFC/ml s'aïllen: *Streptococcus viridans* 8, *Staphylococcus epidermidis* 1, *Streptococcus* grup F 1 i *Candida* spp. 1. Dels aïllaments per sota del punt de tall establert, s'identifiquen els següents: *Streptococcus viridans* 2, *Staphylococcus epidermidis* 1, *Neisseria* spp. 1, *Corynebacterium* 1 i *Candida* spp. 1. Tots els pacients reberen tractament antibiòtic i a les 72 h es repeteix l'obtenció de mostres via broncofibroscopi. Tots els gèrmens s'erradiquen a excepció de 1 *Haemophilus influenzae*, 3 *Streptococcus* spp. i les 2 *Stenotrophomona maltophilia*. De les 38 parelles de serologies obtingudes, 15 (40%) resulten positives, encara que només en 8 (21%) d'elles resulta l'única mostra microbiològica positiva. Comparant les principals variables de gravetat (FEV 1 %, APACHE II, dies de ventilació mecànica i dies d'estada a l'UCI) del grup de pacients amb algun tipus de mostra positiva amb els que no se'n aïllà cap, no es demostren diferències

significatives. No s'expressen els resultats microbiològics en funció del grau d'obstrucció.

En el mateix 1998, un grup italià (88) reproduïx l'esquema de la nostra primera publicació. Setze pacients amb MPOC estable i 40 exacerbats són estudiats, aportant idèntics resultats en quant al percentatge: 25% del primer grup estaven colonitzats i 52% dels aguditzats infectats.

Aquest 1999 han aparegut 2 series més, coincidents en el mateix número de l'European Respiratory Journal i que analitzen, totes dues, els factors de risc associats a la colonització. La primera correspon al grup de Zalacaín *et al*(89) en que compara 88 pacients ambulatoris bronquitis crònics i MPOC estabilitzada amb 20 subjectes sans. A banda de l'estudi multivariant amb els factors de risc (edat, grau d'obstrucció, hàbit tabàquic, paquet-any de tabac i alteracions radiològiques), aquest estudi aporta per primera vegada el control citològic (detecció de cèl·lules escamoses) com a garantia de qualitat de la mostra, així com l'anàlisi dels cultius positius respecte el grau d'obstrucció. El punt de tall es considera 10^3 UFC/ml. El raspall protegit demostra creixement significatiu en 36 (40%) dels pacients, obtenint 45 gèrmens: *Haemophilus influenzae* 13 (28%), *Streptococcus viridans* 11 (24%), *Streptococcus pneumoniae* 7 (15%), *Moraxella catarrhalis* 4 (8,8%), *Echerichia coli* 2 (4,4%), Estafilococ coagulasa negatiu 2 (4,4%), *Staphylococcus aureus* 1 (2,2%), *Prevotella melaninogenicus* 1 (2,2%) *Peptostreptococcus anaerobius* 1 (2,2%) i *Streptococcus sanguis* 1 (2,2%). El nombre de cultius polimicrobians fou de 9: en 7 s'aïllava *Streptococcus viridans* i en els altres 2 s'aïllava *Streptococcus pneumoniae*. Si

només es tenen en compte els MPP la proporció és de: 27 pacients (30%) amb 29 microorganismes. En 7 pacients la concentració superava 10^4 UFC/ml (7,9%). Per sota de 10^3 UFC/ml es cultivaren: *Streptococcus viridans* 4, *Moraxella catarrhalis* 1, *Streptococcus pneumoniae* 1, *Neisseria* spp. 2, *Haemophilus influenzae* 1, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Neisseria meningitidis*. Per sota de 10^2 UFC/ml: *Escherichia coli* 1, *Streptococcus viridans* 2, *Neisseria* spp. 1. Del grup control sols en 1 dels 20 subjectes s'aïlla algun tipus de germen (2×10^2 UFC/ml de *Streptococcus viridans*). Després de l'anàlisi multivariant, l'obstrucció bronquial i l'hàbit tabàquic resultaren predictors independents per a creixement significatiu. La possibilitat d'obtenir cultiu positiu en els pacients amb obstrucció greu respecte els lleus té una odds ratio de 5,11 (95% d'interval de confiança amb límits de 1,4 a 17,9; $p = 0,01$), i la possibilitat d'estar colonitzat en fumadors respecte els no fumadors és també alta, amb una odds ratio de 3,17 (95% d'interval de confiança amb límits de 2,8-8; $p=0,015$). L'estudi citològic permeté eliminar a 4 pacients per a contaminació orofaríngia, el que representa un 3,7% de les mostres. El tercer aspecte a comentar d'aquesta publicació és l'anàlisi de la microbiologia en relació amb el grau d'obstrucció. La distribució dels 29 MPP és la següent: 16 en els greus, 10 en els moderats i 3 en els lleus.

L'últim dels treballs publicats correspon al nostre grup (1) i en ell es valoren els factors de risc associats a la colonització. Aquest article és el segon i últim dels que constitueixen la present tesi (veure apartat 4).

B. El raspall protegit en subjectes normals:

En al menys en 5 treballs publicats es cultiva la via aèries de subjectes normals. Aquests en són els resultats expressats en la tabla-resum. Les referències bibliogràfiques corresponen a Zalacain *et al* (90), Pollock *et al*(82), Cabello *et al*(65), Riise *et al* (85) i Kirkpatrick *et al* (64).

Taula 8. Raspall protegit en subjectes normals

Autors	Nº pac	Nº + Pac	Nº aill.	Gèrmens	Nº	UFC/ml
Zalacain	20	1 (5%)	1	<i>S. viridans</i>	1	2×10^2
Pollock	35	12 (34%)	?	<i>S. viridans</i> ?	2 ?	10^3 $< 10^3$
Cabello	16	5 (31%)	6	<i>S. viridans</i> <i>S. viridans</i> <i>Streptococcus</i> grup D <i>Staphylococcus aureus</i>	3 1 1 1	10^1 2×10^2 5×10^2 4×10^2
Riise	13	6 (46%)	12	<i>Estreptococ</i> α -hemolític Estafilococ coagulasa- <i>Staphylococcus aureus</i> Altres	6 3 1 2	4 amb 10^1 8 amb 10^2

Kirkpratick	8	1 (12,5%)	4	<i>Estreptococ α-hemolític</i>	1	3×10^1
				<i>Neisseria spp.</i>	1	2×10^1
				<i>B. melaninogenicus</i>	1	7×10^1
				<i>Veillonella</i>	1	$2,5 \times 10^1$

Si es considera, tal com proposava Fagon *et al.* (91) que no és precís cap punt de tall, el total de subjectes sans amb creixement bacterià resulta d'un 28,5%. Dels 23 aïllaments sols apareixen 2 MPP (*Staphylococcus aureus*), la resta són flora comensal.

C. Correlació ente raspall protegit i esput:

Diverses investigacions han buscat la correlació entre la mostra del raspall protegit i l'esput. Les mostres poblacionals són molt heterogènies i no és possible extrapolar la sensibilitat i especificitat. Les referències bibliogràfiques corresponen a Vereen *et al* (84), Pollock *et al* (82), Pang *et al* (72) i Rosell *et al* (92).

Taula 9. Correlació entre raspall protegit i esput

Autors	N	Clínica	Qualitat esput	Grau coincidència
Vereen	18	Bronquitis crònica estable	?	15% total, 38% parcial
Pollock	18	Pneumònia	?	30%
Pang	23	Bronquièctasi estable	?	43% total/parcial
Rosell	8/31	Bronquitis crònica estable	Grau 5 M-W	25% (sensibilitat 28% i especificitat 66%)

En aquest llistat caldria afegir els resultats del treball de Irwin *et al* (50) en els que es correlaciona els cultius d'esput amb els cultius per aspirat transtraqueal pur (control per blau de metilè i citologia). L'anàlisi estadística conclou que la probabilitat d'identificar pel cultiu d'esput, tots els microorganismes presents en l'aspirat transtraqueal, és del 67%, amb sensibilitat del 66% i nul·la especificitat.

D. Interpretació del punt de tall, tècnica, clínica i tipus de gèrmens

Justificació pels cultius quantitius i punt de tall en el diagnòstic de la pneumònia

Els resultats microbiològics del raspall protegit es presentaren en els treballs originals de Wimberley *et al* de forma quantificada: unitats formadores de colònies per mil·lilitre (UFC/ml) amb una doble intenció. En primer lloc poder revertir l'efecte dilucional, ja que el raspall un cop seccionat es col·loca en 1 ml de sèrum fisiològic o Ringer lactat i el material per a cultivar s'obté d'aquest mil·lilitre. La quantitat de secreció recollida en el raspall protegit és aproximadament de 0,01 a 0,001 ml, pel que el factor dilucional respecte l'esput és de 1/100-1/1000. Coneixent aquest factor i la quantitat d'UFC/ml en el cultiu procedent del raspall protegit podem establir les relacions equitatives amb la concentració de gèrmens presents en les secrecions (esput i aspirat traqueobronquial) emergents d'un bloc pneumònic així com del mateix teixit (biòpsia pulmonar postmortem per minitoracotomia) i que a continuació es

comenten. La segona raó per a la quantificació és perquè en el context de pneumònia la quantitat de gèrmens en la secreció bronquial recollida en l'esput que discrimina la flora orofaríngia contaminant o colonitzadora, de la patògena causant de pneumònia és de 10^5 - 10^7 UFC/ml tal com demostraren Monroe i col·laboradors (93,94) i posteriorment Bartlett i Finegold(30). En pacients amb pneumònia i ventilació mecànica, la quantificació dels aspirats traqueobronquials també és capaç de discriminar la flora contaminat orofaríngia de la patògena. En diversos estudis (95), la correlació amb el raspall protegit s'estableix amb el punt de tall de 10^6 UFC/ml, concentració que també és similar als estudis amb esputs abans detallats. Finalment, el cultiu quantitatiu és també necessari per a poder establir l'equivalència amb el cultiu histològic, que representa el "gold-standard" per la pneumònia. Aquests models cadavèrics s'han practicat en el context de la pneumònia associada a la ventilació mecànica. S'ha pogut establir que el punt de tall de 10^3 UFC/ml en el raspall protegit correspon al 10^4 UFC/ml del teixit pulmonar pneumònic en pacients que no rebien tractament antibiòtic (96).

De totes maneres, en una revisió (97) sobre el rendiment del raspall protegit en el maneig de la pneumònia associada a la ventilació mecànica en la que es conjuguen els resultats dels cultius amb la probabilitat pre-test de patir una malaltia i el risc/benefici d'iniciar un tractament, es conclou que: (a) l'índex bacterià (98) (sumatori de les concentracions logarítmiques) és més discriminatiu que la informació aportada per les UFC/ml i (b) que el punt de tall és variable en funció d'aquestes dues variables.

Taula 10. Punt de tall del raspall protegit en el diagnòstic de pneumònia, expressat com a índex bacterià

Probabilitat diagnòstica pre-test	Risc/benefici d'iniciar antibiòtic		
	Alt	Intermedi	Baix
Sospita	3	1	1
Incerta	3	2	1
Dubtosa	4	3	2

En resum, el punt de tall en els resultats del raspall protegit en el context de pneumònia és necessari per a poder establir en la gran majoria de situacions diagnòstiques, la línia divisòria entre infecció i colonització, infecció avortada o la possibilitat de contaminació de la mostra.

Aplicació del punt de tall en el context de la MPOC

Mentre que el punt de tall dels cultius en el context de pneumònia aconsegueix un ampli consens entre investigadors independents i té un referent o “gold standard” que l'avalua, no s'aconsegueix el mateix en el diagnòstic d'infecció bronquial. En la Taula següent s'expressen els punts de tall escollits en els diferents estudis practicats.

Taula 11. Punt de tall del raspall protegit utilitzat pels diferents autors

Autors	Any	Clínica	Punt de tall
Pollock <i>et al</i>	1982	BC aguditzada	10 ³

Vereen <i>et al</i>	1986	BC estable	Cap
Pang <i>et al</i>	1989	Bronquièctasi estables	10 ³
Fagon <i>et al</i>	1990	BC aguditzada, ventilació mecànica	Cap
Riise <i>et al</i>	1994	MPOC estable	10 ³
Martinez <i>et al</i>	1994	BC aguditzada	10 ³
Cabello <i>et al</i>	1997	MPOC estable	10 ²
Zalacain <i>et al</i>	1997	MPOC aguditzada i estable	10 ³
Soler <i>et al</i>	1998	MPOC aguditzada i ventilació mecànica	10 ²
Zalacain <i>et al</i>	1999	MPOC estable	10 ³

L'interès d'establir un punt de tall en els cultius del raspall protegit en l'estudi de la població endobronquial de la MPOC radicaria en descartar contaminació ja que la presència de gèrmens colonitzadors ,al menys en fase estable, ja és el propòsit de la investigació. En fase d'agudització de la MPOC, la presència de cultius amb baixos comptatges bacterians indueix a clars dubtes sobre la seva patogenicitat i s'imposa per aquest motiu la necessitat d'un punt de tall així com etiquetar els microorganismes entre potencialment patògens (MPP) d'aquells que no ho són (MnPP).

E. Distribució de les diferents concentracions de gèrmens en funció de la clínica

S'han escollit les referències que permetessin una anàlisi detallada dels diferents resultats per cada concentració. En algunes cites ha estat precisa la interpretació del text, gràfiques i taules per a poder aportar totes les dades. En els subjectes sans s'han escollit les referències de Fagon *et al*, Zalacain *et al*

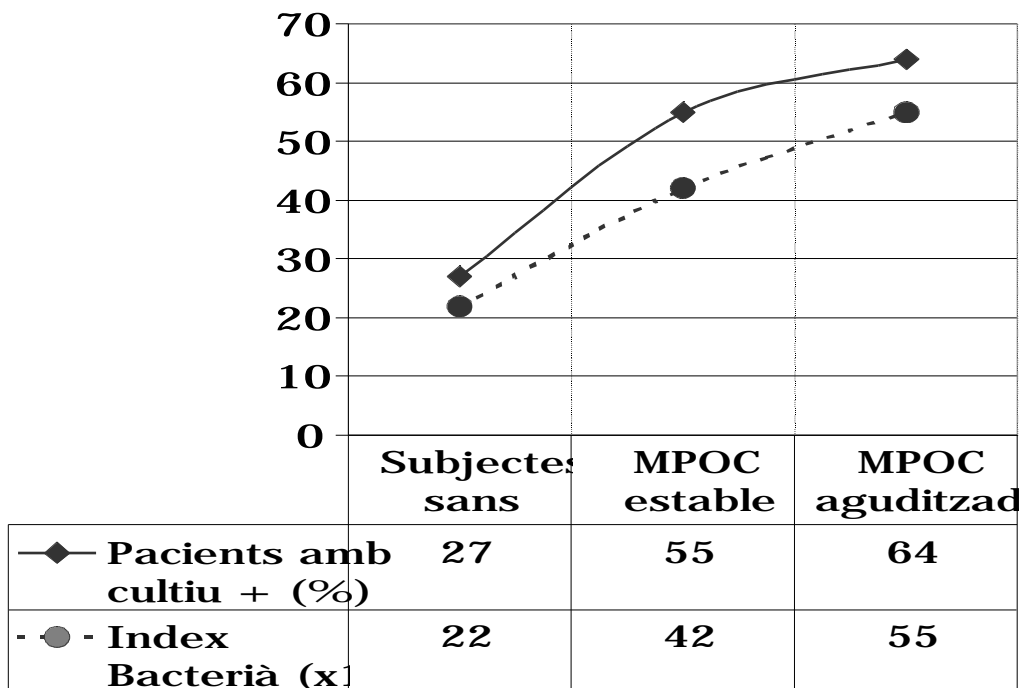
(89), Pollock *et al* (82), Cabello *et al* (65), Riise *et al* (85) y Kirkpatrick *et al* (64), en la MPOC estable els articles de Monsó *et al* (2), Cabello *et al* (65), Zalacain *et al* (87,89) i Riise *et al* (85) ; per la MPOC aguditzada els estudis de Monsó *et al* {Monso, Ruiz, *et al.* 1995 ID: 51}, Zalacin *et al* (87), Martinez *et al* (86) y Fagon *et al* (91).

En la Taula comparativa s'han introduït també els paràmetres com el nº d'aïllaments per subjecte amb cultiu positiu o bé l'índex bacterià per subjecte amb cultiu positiu. Les diferències són estadísticament significatives ($p < 0,0001$ amb el test asimptòtic del Chi-quadrat) entre les tres poblacions estudiades, mostrant unes OR sans/MPOC estable de 3,2 (IC 95%, 1,9-5,6) i OR sans/MPOC aguditzat de 4,3 (IC 95%, 2,6-8,7).

Taula 12. Patró bacterià en subjectes sans, MPOC estable aguditzada

	Subjectes sans	MPOC estable	MPOC aguditzada
Nº total pacients	92	178	115
Nº total pacients amb cultiu positiu	25	98	74
% pacients amb cultiu positiu	27%	55%	64%
Nº aïllaments	37	154	118
Nº aïllaments per pacients amb cultiu positiu	1,4	1,6	1,6
Índex bacterià/pacient amb cultiu positiu	2,2	4,2	5,5

Figura 1. Cultius positius (sense punt de tall) i Index Bacterià (x10 per a poder ser expressat gràficament) com a indicador de càrrega bacteriana, en subjectes sans, MPOC estable i MPOC aguditzada.



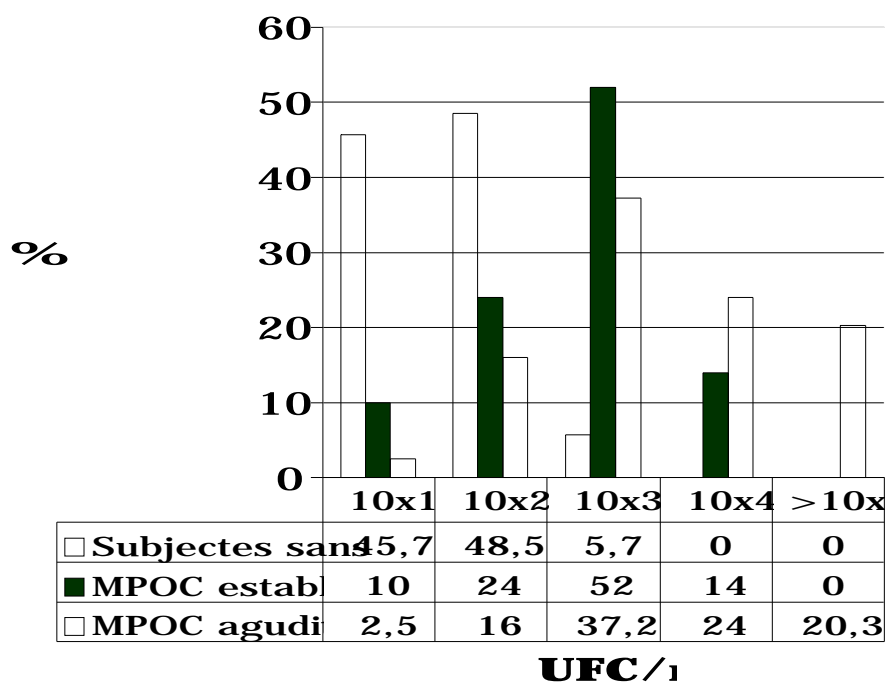
Si s'analitza les cocentracions bacterianes, expressades com a UFC/ml, en les diferents situacions clíniques, observem com aquestes tendeixen a ser menys concentrades en la població sana mentre que s'acumula per sobre de 10^3 UFC/ml en la MPOC aguditzada. Aquestes diferències són estadísticament significatives (Test exacte de Fisher, $p < 0,0001$).

Taula 13 . Distribució de la població bacteriana segons concentracions

	Subjectes sans		MPOC estable		MPOC aguditzada	
10^1 UFC/ml	16	45,7%	16	10%	3	2,5%

10 ² UFC/ml	17	48,5%	37	24%	19	16%
10 ³ UFC/ml	2	5,7%	80	52%	44	37,2%
10 ⁴ UFC/ml	0	-	21	14%	28	24%
10 ⁵ UFC/ml	0	-	0	-	20	17%
10 ⁶ UFC/ml	0	-	0	-	1	0,8%
10 ⁷ UFC/ml	0	-	0	-	3	2,5%

En la figura 2 es presenta gràficament la distribució bacteriana en les tres situacions clíniques (sans, MPOC estable i MPOC aguditzada)



La anàlisi presentada reflecteix el conjunt bacterià sense establir diferències entre MPP i els MnPP. A continuació es presenten els resultats separant ambdues poblacions. En els subjectes sans s'ha escollit les

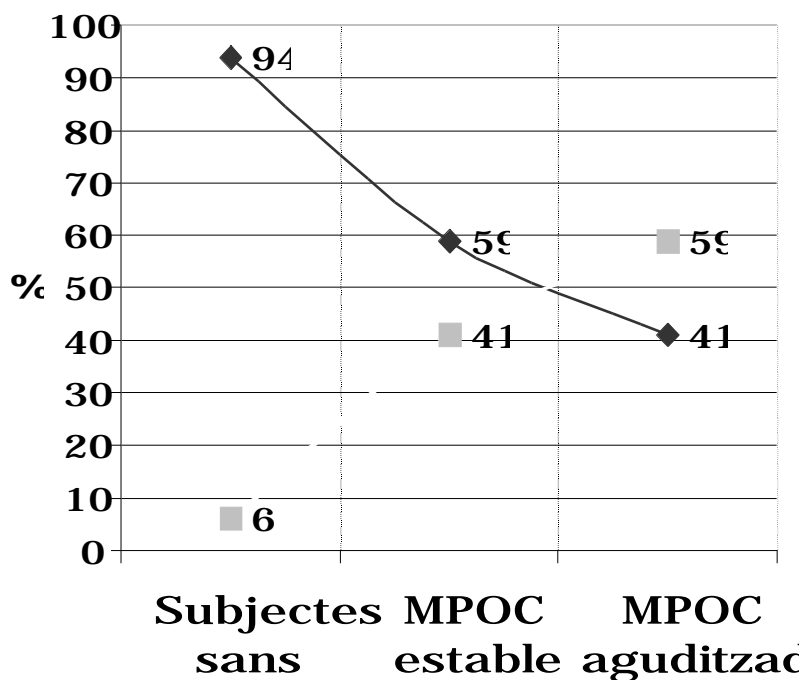
referències de Fagon *et al*, Zalacain *et al* (89), Pollock *et al* (82), Cabello *et al* (65), Riise *et al* (85) y Kirkpatrick *et al* (64), en la MPOC estable els articles de Monsó *et al* (2), Cabello *et al* (65), Zalacain *et al* (87,89) i Riise *et al* (85) ; per la MPOC aguditzada els estudis de Monsó *et al* (2), Zalacain *et al* (87), Martinez *et al* (86) y Fagon *et al* (91) i s´ha pogut incorporar l'article de Soleret *et al* (71).

Taula 14. Proporció de MPP i MnPP en subjectes sans, MPOC estable i aguditzada

	Subjectes sans	MPOC estable	MPOC aguditzada
Nº aïllaments	35	154	162
MnPP	33 (94%)	91 (59%)	66 (41%)
MPP	2 (6%)	63 (41%)	96 (59%)

Aquestes diferències són estadísticament significatives (Test Chi-quadrat, $p < 0,0001$), amb OR sans/MPOC estable de 0,09 (IC 95%, 0,02-0,4) i OR sans/MPOC aguditzat de 0,04 (IC 95%, 0,01-0,2). En la figura 3 s'exposa gràficament els tipus de poblacions (MnPP i MPP) en les diferents situacions clíniques. S'observa com en la situació d'agudització té lloc una inversió de poblacions bacterianes entre MnPP i MPP.

Figura 3. Tipus de població (MPP) i (MnPP) segons la situació clínica



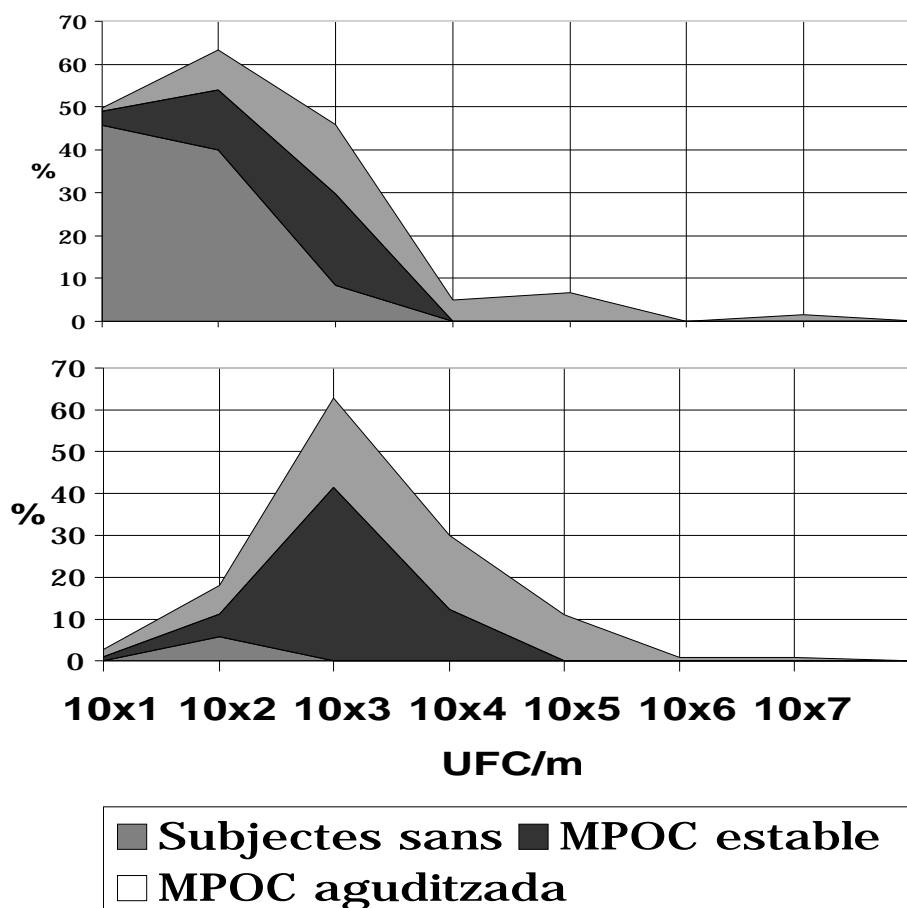
Una visió més profunda requereix conèixer la distribució del tipus de germen (MPP o MnPP) en funció de les seves concentracions . En els subjectes sans s´ha escollit les referències de Zalacain *et al* (89), Pollock *et al* (82), Cabello *et al* (65), Riise *et al* (85) y Kirkpatrick *et al* (64), en la MPOC estable els articles de Monsó *et al* (2), Zalacain *et al* (87,89); per la MPOC aguditzada els estudis de Monsó *et al*, Zalacin *et al* (87), Martinez *et al* (86) y Fagon *et al* (91) i s´ha pogut incorporar l'article de Soleret *et al* (71).

Taula 15. Distribució dels MPP i MnPP segons la seva concentració en subjectes sans, MPOC estable i aguditzada

	Subjectes sans (n=35)		MPOC estable (n=89)		MPOC aguditzada (n=118)	
	MPP	MnPP	MPP	MnPP	MPP	MnPP
10^1	0	16 (45,7%)	1 (1,1%)	3 (3,3%)	2 (1,7%)	1 (0,8%)
10^2	2 (5,7%)	14 (40%)	5 (5,6%)	13 (14,6%)	8 (6,7%)	11 (9,3%)
10^3	0	3 (8,5%)	37 (41,5%)	19 (21,3%)	25 (21,2%)	19 (16,1%)
10^4	0	0	11 (12,3%)	0	21 (17,8%)	6 (5%)
10^5	0	0	0	0	13 (11%)	8 (6,7%)
10^6	0	0	0	0	1 (0,8%)	0
10^7	0	0	0	0	1 (0,8%)	2 (1,7%)

La distribució de les poblacions exhibeix com els MnPP en qualsevol de les tres situacions clíniques es troben en concentracions baixes però predominant en els sans, mentre que els MPP s'acumulen en concentracions més altes. Les diferents concentracions de MPP presenten diferències estadísticament significatives ($p=0,0005$, Test de Fisher) en les tres poblacions estudiades; així com també les diferents concentracions de MnPP ($p < 0,0001$, Test de Fisher).

Figura 4. Distribució de les poblacions de MnPP (1er gràfic) i MPP (2on gràfic) segons la concentració bacteriana (presentació en àrees apilades)



A continuació es presenta la relació entre tipus de gèrmens potencialment patògens i les seves concentracions durant la MPOC estable i aguditzada, basant-se en les mateixes referències bibliogràfiques anteriors.

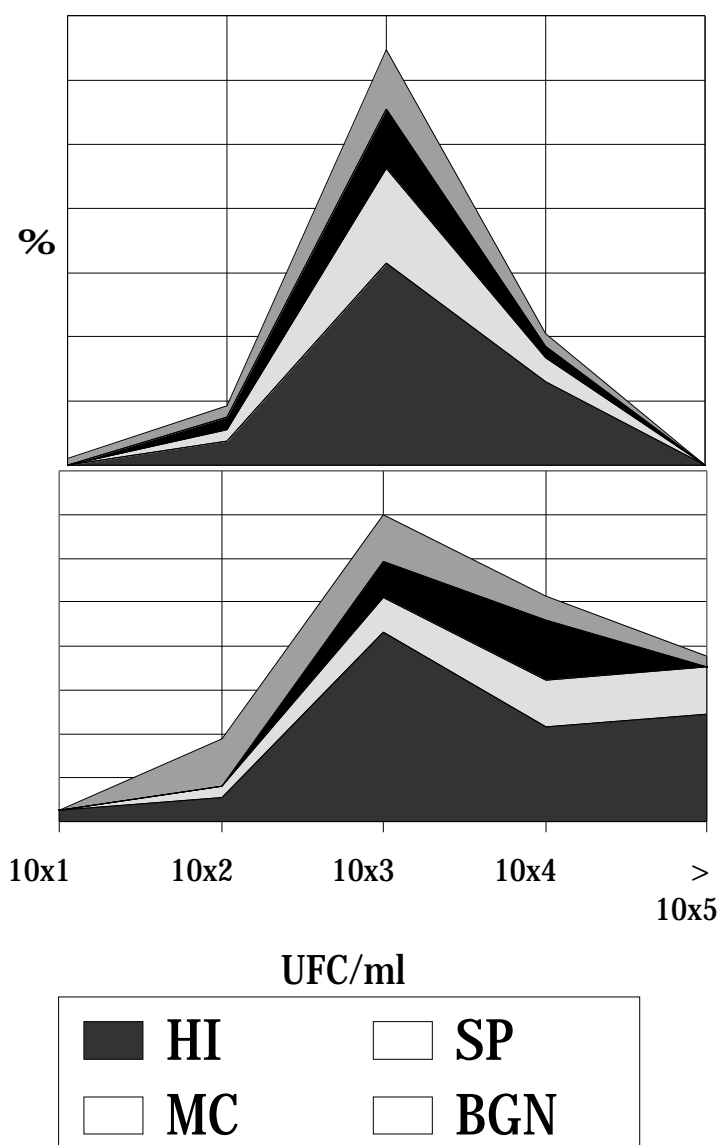
Taula 16 . Distribució del MPP segons les seves concentracions en la MPOC estable

	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	Total
HI	0	2	17	7	26
	0	3,70%	31,48%	13%	48,1%
SP	0	1	8	2	11
	0	1,85%	14,8%	3,7%	20,3%
MC	0	1	5	1	7
	0	1,85%	9,25%	1,85%	12,9%
BGN	1	1	5	1	8
	1,85%	1,85%	9,25%	1,85%	14,8%
SA	0	0	2	0	2
	0	0	3,7%	0	3,7%
TOTAL	1	5	37	11	54
	1,85%	9,25%	65,5%	20,3%	100%

Taula 17. Distribució del MPP segons les seves concentracions en la MPOC aguditzada

	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	Total
HI	1	2	16	8	7	1	1	36
	1,35%	2,7%	21,6%	10,8%	9,45%	1,35%	1,35%	48,6%
SP	0	1	3	4	4	0	0	12
	0	1,35%	4%	5,4%	5,4%	0	0	16,21%
MC	0	0	3	5	0	0	0	8
	0	0	4%	6,75%	0	0	0	10,81%
BGN	0	4	4	2	1	0	0	11
	0	5,4%	5,4%	2,7%	1,35%	0	0	14,86%
SA	0	2	2	0	0	0	0	4
	0	2,7%	2,7%	0	0	0	0	5,4%
TOTAL	2	9	29	19	13	1	1	74
	2,7%	12,2%	39,2%	25,6%	17,5%	1,35%	1,35%	100%

Gràficament s'exposa en la Figura 5, agrupant-se les concentracions superiors a 10^5 UFC/ml. El primer gràfic correspon a la situació de MPOC estable i el segon en fase d'agudització, expressent-se ambdós en forma d'àrees apilades.



HI: *Haemophilus influenzae* , SP: *Streptococcus pneumoniae* , MC: *Moraxella catarrhalis* , BGN: bacil.ls Gram negatiu, SA: *Staphylococcus aureus*

2.3 FACTORS DE L'HOSTE I DEL GERMEN QUE AFAVOREIXEN LA COLONITZACIÓ

Els estudis amb raspall protegit en pacients amb MPOC estable han demostrat que les vies aèries estan més freqüentment colonitzades, contenen gèrmens a concentracions més altes i la població de MPP augmenta, malgrat no superar als MnPP. Les raons per les que el patró bacteriològic de la MPOC estable difereix de la normalitat rau en el deficient aclariment mucocil·liar i l'alteració del sistema de defensa immunològic. Aquestes condicions de deficient defensa local de l'hoste permeten que aquells gèrmens amb mecanismes adaptatius en aquest medi persisteixin.

2.3.1. Deficient aclariment mucocil·liar

La constant circulació cefàlica de la secreció traqueobronquial pel moviment harmònic del cil·lis de les cèl·lules epitelials, és la primera barrera defensiva que el pulmó presenta en front a les partícules i microorganismes inhalats o aspirats. Diferents estudis amb aerosol radioopac (99) o radiofàrmac (100,101), han comprovat com l'aclariment mucocil·liar està enlentit en els pacients amb MPOC. Els mecanismes són diversos:

Alteracions en l'estructura de les vies aèries

L'arbre traqueobronquial del pacient amb MPOC presenta una configuració geomètrica i uns diàmetres diferents al subjecte normal. La

proliferació de cèl·lules calicilars, la hipertròfia de les glàndules submucoses, la hiperplàsia muscular, l'infiltrat inflamatori epitelial, l'atrofia dels cartílags, l'obliteració i tortuositat bronquiolar (12) provoquen una disminució de les llums de distribució irregular on la circulació d'aire i secreció traqueobronquial no és uniforme (102,103), situació que afavoreix les condicions per a la infecció bacteriana (104).

Alteracions de l'epiteli bronquial

L'epiteli bronquial presenta diverses lesions que afavoreixen l'adherència i penetració de bacteris. La hipertròfia de cèl·lules calicilars provocarà un major producció de moc i la descamació de cèl·lules cil·liades deixarà amplies zones denudades, on els bacteris podran adherir-se. En la publicació de Chodosh i Medici (105) es conclou que el pacient amb bronquitis crònica no exacerbada perd $5,26 \text{ cm}^2$ d'epiteli bronquial al dia, a partir del càlcul i quantificació de les cèl·lules contingudes en esputs seriats. Riise *et al* (106) calculen a partir de la mostra obtinguda amb raspall citològic durant la broncoscòpia flexible que la proporció cel·lular és diferent en el fumador amb bronquitis crònica d'aquell subjecte no fumador asimptomàtic. En el primer grup es comptabilitzen més cèl·lules calicilar (mitja 20; DE 8,6) i menys cèl·lules epitelials (mitja 74,1; DE 9,4) que els subjectes sans (mitja de 9,2; DE 3,8 i mitja de 84,7 DE 6,6, respectivament). El grup de S. Rennard (62) ha investigat la població cel·lular epitelial utilitzat la primera fracció de la RBA en pacients amb MPOC, fumadors asimptomàtics i voluntaris sans. Les cèl·lules calicilars es troben augmentades

de forma significativa en el dos primers grups (mitja 36; DE 2 i mitja 22, DE 2, respectivament) respecte als voluntaris sans (mitja 9, DE 1).

Alteració en la secreció traqueobronquial:

El volum de la secreció i les seves propietats bioquímiques i viscoelàstiques estan alterades en el pacient amb bronquitis crònica. Els espus estudiats mostren una menor elasticitat, però amb una incrementada viscositat que juntament amb l'augment del gruix de la secreció provoquen que el flux de la mateixa s'enlenteixi. A nivell bioquímic es detecta un augment d'albumina, sialomucina, lípids, i ADN (107), així com una composició iònica més isotònica(108). Les mucines són menys àcides que en subjectes normals (109). En un model animal (110) s'observa que les secrecions són hipotòniques i que incrementant el seu contingut salí es produeix un augment de la velocitat de transport. A diferència dels pacients amb fibrosi quística, el tractament amb DNAasa no resulta efectiu en els pacients amb bronquitis crònica (111).

Disfunció del sistema cil·liar

Hi ha un gran nombre d'alteracions ultraestructurals cil·liar associats a la bronquitis crònica (112). En l'estudi de Lungarella i col·laboradors (113) detecten entre 8-28% d'anormalitats en 18 pacients amb bronquitis crònica, essent les més freqüents cil·lis gegants amb axonemes complets o incomplets, manca de doblats de microtúbuls i cil·lis compostos. Verra *et al* (114) examinen l'ultraestructura cil·liar de bronquítics crònics amb MPOC lleugera-moderada, ex

-fumadors i sans, observant que les anomalies en el primer i segon grup són significativament superiors als sans (16,5% DE 2,7%, 17,5% DE 7% i 0,7% DE 0,2%, respectivament). Malgrat que en algun estudi (115) s'ha demostrat la normalització de les alteracions citològiques de l'esput dels exfumadors (macròfags pigmentats, cèl·lules columnars, metaplàsia, espirals mucoides), en la mencionada publicació de Verra *et al*, en 3 del 5 exfumadors es troben un alt percentatge d'alteracions cil·liar, suggerint que el tabaquisme crònic en pacients amb MPOC podria alterar de forma irreversible els mecanismes de la cil·liogènesi per transformació fenotípica de les cèl·lules cil·liades.

A banda de les alteracions ultraestructurals, la infecció (bacteriana i vírica) indueix alteracions en la motilitat cil·liar (116) o bé en la seva orientació (117).

2.3.2 Mecanismes immunològics locals

Defensa cel·lular:

El substracte patològic trobat en bronquièctasi suggereix la presència d'una reacció immunològica cel·lular (118). No hi ha evidència de que la resposta mediada pels limfòcits tipus T als antígens dels bacteris comensals sigui deficient (119). Nogensmenys, la defensa cel·lular no específica podria no ser totalment beneficiosa en els pacients amb bronquitis crònica i MPOC. Els radicals lliures generats pels fagòcits activats que actuen contra la invasió bacteriana, alhora també destrueixen i inactiven les antiproteases(120). El

perque aquest procés és completament reversible en la pneumònia però sembla persistent en la bronquitis crònica encara no està resolt (104).

Defensa humoral:

Un conjunt de més de 50 proteïnes solubles formen part de les secrecions bronquials. El seu origen és local, plasmàtic o d'ambdós.

- a. Lisozima: es sintetitza en les cèl·lules calicials i també en neutròfils. La seva acció és hidrolitzar la paret de molts bacteris, probablement amb la comunió de complement i d'altres enzims, doncs la seva acció aïllada no és efectiva (121). Alguns autors (18) han detectat nivells baixos en aquells pacients amb bronquitis crònica amb aguditzacions de repetició, relacionant-ho amb un augment de l'adhesivitat bacteriana.
- b. Lactoferrina: és una glicoproteïna que s'uneix al ferro i transporta ions fèrrics a dins les cèl·lules, també inhibeix el creixement bacterià encara que es desconeix el mecanisme d'aquesta acció (121) . Ja que reté ferro a $\text{pH} < 4,5$; alguns gèrmens com *Haemophilus influenzae* que precisen de Fe poden utilitzar-lo com a font. La fase sol de l'esput dels pacients amb bronquitis crònica té nivells superiors que els subjectes sans (122).
- c. Peroxidasa: activa en front a bacteris, fongs i virus.
- d. Fibronectines: és una glicoproteïna de gran pes mol.lecular que inhibeix l'adhesió de bacils gram negatius i estreptococs a les cèl·lules epitelials,
- e. Antiproteases: regulen l'activitat enzimàtica de les proteases d'origen neutrofilic i bacterianes. Algunes antiproteases són: l'alfa-1-antitripsina, que

és l'inhibidor més potent de l'elastasa dels neutròfils i la de la *Pseudomonas aeruginosa*, o l'inhibidor de les metal·loproteïna bacteriana que degrada la IgA.

- f. Citocines: són proteïnes secretades per les principals cèl·lules inflamatòries, essent la seva principal acció la de modular la resposta inflamatòria, tot activant altres cèl·lules i a elles mateixes. Les seves accions més rellevants són augmentar l'expressió de mol·lècules d'adhesió en la superfície dels macròfags (FNT), reclutar diferents tipus de cèl·lules immunes cap el focus inflamatori (IL-8), estimular els mecanismes de defensa intracel·lular (interferó-) i intervenir en la resposta immune mediada pels limfòcits B i T.
- g. Complement: encara que quasi tots els components poden ser sintetitzats pels macròfags alveolars, la majoria deriven de la difusió plasmàtica. La via alterna és la més important: el C3a i C5a són potents quimiotàctics per a neutròfils, monòcits i eosinòfils; el C3b és un estimulant inespecífic d'anticossos, de producció de limfocines i de la citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos; el C5a té també activitat opsonitzant.
- h. Immunoglobulines: La documentació serològica d'infecció pels gèrmens comensals de l'orofaringe resulta pràcticament impossible en pacients amb MPOC, ja que es determinen títols també fora dels episodis aguts (104). Actualment és possible determinar anticossos dirigits contra antígens específics de l'estructura dels gèrmens potencialment patògens (123). Aquests es poden trobar tant en sèrum com en l'esput, pel que es pot

interpretar que no existeix cap defecte en la síntesi de classes o subclasses d'IgA o IgG(124). La IgA és la immunoglobulina amb més abundant i pot arribar a representar fins el 10% de totes les proteïnes de la llum bronquial. La IgA secretora és una combinació entre la IgA produïda en el plasma i un component secretori sintetitzat en l'epiteli. La seva acció és aglutinar els bacteris i evitar la seva adhesió a la superfície bronquial. La subclasse A1 és la predominant en el tracte respiratori.

És possible detectar anticossos específics contra *Haemophilus influenzae* després d'un tractament antibiòtic adequat i fins i tot en períodes de cultiu negatiu (124). Aquest fet podria explicar-se per una anòmala opsonització o bé per una variació antigènica dels gèrmens. Aquesta podria ser la raó per la que la vacunació oral amb *Haemophilus influenzae* resulta poc efectiva (104). El grup de Riise va publicar el 1998 (125) un estudi comparatiu del perfil immunològic en sèrum i RBA de pacients amb bronquitis crònica no obstructiva, bronquitis aguda de repetició i fumadors asimptomàtics. Es determinaren les diferents classes i subclasses d'immunoglobulines, així com els fenotips dels limfòcits, la producció de citocines en front a diferents estímuls i l'activitat de les cèl·lules natural killer (NK). No es detectaren importants alteracions en els diferents marcadors de l'activitat immunològica cel·lular i humoral.

2.3.3. Mecanismes adaptatius dels gèrmens colonitzadors

Els bacteris que causen infeccions bronquials posseeixen una varietat d'estratègies per a poder persistir en la via aèria i que s'expressen en la següent taula.

Taula 18. Factors de virulència dels bacteris causants d'infecció bronquial

1/EXOPRODUCTES QUE ALTEREN L'ACLARIMENT MUCOCIL·LIAR
Estimulació de la producció de moc
Cil.liotoxicitat
Dany epitelial
2/MECANISMES D'ADHERÈNCIA BACTERIANA A L'EPITELI
3/MECANISMES DE RESISTÈNCIA AL CONTROL IMMUNOLÒGIC
Proteases contra IgA1
Heterogenicitat antigènica de la superfície bacteriana
Amagatalls (Microcolònies recobertes de gel polisacàrid/Endocitosi)

1/ EXOPRODUCTES QUE ALTEREN L'ACLARIMENT MUCOCIL·LIAR

Interacció bacteriana amb el moc

El primer contacte del bacteri inhalat amb la mucosa respiratòria és amb la secreció bronquial. L'adherència bacteriana amb el moc probablement involucra dos tipus de mecanismes: l'específic (adhesina-receptor) i l'inespecífic.

L'afinitat dels bacteris amb el moc, i la seva relativa poca adherència amb l'epiteli sa, explicaria el perquè no infecten les vies aèries normals amb l'aclariment mucocil·liar conservat. Tenen capacitat per adherir-se al moc: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, però es desconeix de *Mycoplasma pneumoniae* ni *Bordetella pertussis*. En la MPOC i bronquitis crònica, l'enlentiment de l'aclariment mucocil·liar dona temps als bacteris per a produir factors virulents en quantitats suficients per a colonitzar i infectar. Tant *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* com *Pseudomonas aeruginosa* tenen capacitat per a estimular la producció de moc (126).

Interacció bacteriana sobre els cil·lis

Es coneixen alguns dels factors cil·lioinhibidors dels bacteris més freqüentment implicats en la infecció bronquial: *Haemophilus influenzae* segrega glicopèptids de baix pes molecular, *Streptococcus pneumoniae* produeix pneumolisina i *Pseudomonas aeruginosa* sintetitza dos pigments fenacínics (piocianina i 1-hidroxifenacina) i el rhamnolipid. Tots aquests factors cil·liotòxics poden enlentir la velocitat de moviment així com descoordinar-lo, tot convertint-lo en eficaç.

Dany i invasió epitelial

Els gèrmens implicats presenten diferents mecanismes lesius sobre l'epiteli bronquial. Hi ha evidència que les unions interepitelials poden trencar-se en cultius d'epiteli nasofaringi humà en presència de *Streptococcus pneumoniae*(127), *Haemophilus influenzae* (128) o *Pseudomonas*

aeruginosa(129), encara que els factors bacterians inductors no estan encara aclarits.

Un producte bacterià que provoca dany cel·lular és la proteasa segregada per *Pseudomonas aeruginosa*. També s'ha comprovat la invasivitat epitelial de *Haemophilus influenzae* en evidenciar la seva localització intercel·lular en cultius d'adenoides(130) i subepiteliais en biòpsies bronquials amb cultius de secrecions negatius(131).*Neisseria meningitidis*, i probablement *Moraxella catarrhalis* per la seva estreta proximitat, també s'han observat en localitzacions intracel·lulars en cultius de teixit nasofaríngi humà(130). No es coneix si *Streptococcus pneumoniae* presenta invasivitat intra o intercel·lular(132).

2/ ADHERÈNCIA BACTERIANA A L'EPITELI BRONQUIAL

La unió dels bacteris a la superfície mucosa es considera un fet crucial en la majoria de malalties infeccioses. Només si el germen colonitzador no és eliminat de la superfície de l'epiteli bronquial pels mecanismes d'aclariment mucocil·liar, podrà sobreviure i proliferar. La unió bacteri-epiteli té lloc a partir de les interaccions específiques entre les adhesines de la superfície bacteriana i els receptors de la superfície epitelial. Les adhesines bacterianes poden constituir fimbries i no. Les fimbries són un polímer piliforme d'ídèntiques subunitats proteiques que actua com una àncora. *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* expressen aquest tipus d'adhesines. Altres formes no mediades per fimbries

s'han descrit en l'*Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae*.

Els receptors pels diferents tipus d'adhesines (fimbries o no) són habitualment oligosacàrids en glicopèptids i glicoproteïnes. L'estructura dels mateixos és molt diversa, però la majoria dels patògens tenen en comú la unió amb l'asialo-ganglòsid GM1. La distribució dels receptors en els diferents epitelis no és uniforme. Per exemple, *Haemophilus influenzae* s'adhereix bé sobre les cèl·lules epitelials cil·liades però no sobre les cèl·lules escamoses o cúbiques del mateix epiteli bronquial. Només *Mycoplasma pneumoniae* i *Bordetella pertussis* s'adhereixen a l'epiteli sa. La resta precisarà que aquest hagi estat lesionat per toxines o proteases (128) (121). L'epiteli danyat exposa nous receptors en les cèl·lules malmeses, en la membrana basal i en les cèl·lules que han migrat i diferenciat per a reparar el dany. Per aquesta raó, tant el tabaquisme com la bronquitis crònica s'associen a una adherència bacteriana augmentada, concretament *Streptococcus pneumoniae* en fumadors i *Haemophilus influenzae* en la bronquitis crònica. Alguns autors proposen que l'augment de l'adhesivitat bacteriana a l'epiteli podria ser la causa de que uns pacients amb bronquitis crònica presentessin més aguditzacions que els altres. En dos grups de pacients similars, Taylor *et* (133) observen com el grup de pacients amb múltiples aguditzacions presentava una major adherència de la microflora indígena a les cèl·lules epitelials de la boca, així com un augment de l'adhesivitat *in vitro* de l'*Haemophilus influenzae* també per les cèl·lules epitelials de la boca. En un altre context, un grup de pediatres(134) en un

estudi prospectiu per a determinar quins factors s'associen a les otitis de repetició, observen com el percentatge d'adherència de *Haemophilus influenzae* a les cèl·lules epitelials de la boca s'incrementa de forma significativa en el grup que presenta més infeccions.

Taula 19. Adherència bacteriana sobre diferents superfícies

Bacteri	Moc	Epiteli sa	Epiteli danyat	Membrana basal
<i>S. pneumoniae</i>	+	-	+	+
<i>H. influenzae</i>	+	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	+	+
<i>S. aureus</i>	+	-	?	+
<i>M. pneumoniae</i>	?	+	?	?
<i>B. pertussis</i>	?	+	?	?

3/ MECANISMES DE RESISTÈNCIA AL CONTROL IMMUNOLÒGIC

Els microorganismes utilitzen diferents mecanismes per a evadir la defensa immunològica de l'hoste, ja sigui destruint les immunoglobulines o bé burlant la seva presència (canvi de la composició antigènica de la superfície o bé situant-se en localitzacions inaccessibles).

Proteases contra IgA1

Tant *Streptococcus pneumoniae*, com *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* sintetitzen aquest enzim que inactiva la IgA1 de la superfície bronquial. *H. influenzae* és capaç de presentar, a més, proteases IgA1 antigènicament diferents per tal d'evitar la resposta immunitària de l'hoste contra la mateixa. Aquestes foren les conclusions de la publicació de Lomholt i col·laboradors (135) en aïllaments seqüencials de nens sans.

Heterogenicitat antigènica de la superfície bacteriana

La membrana externa de *Moraxella catarrhalis* i *Haemophilus influenzae* no encapsulat té contacte directe amb els components del sistema immunològic de defensa. En el *Streptococcus pneumoniae*, la càpsula de polisacàrids i algunes de les proteïnes de la superfície estan involucrades amb els components de la defensa immunològica. La variació dels antigens externs de la membrana i dels polisacàrids capsulars, és un mecanisme dels bacteris per escapar del contacte amb els anticossos.

S'ha tipificat més de 80 tipus antigènicament diferents de *S.pneumoniae* (136). Menys es coneix sobre les proteïnes externes de la membrana de la *M. catarrhalis*, detectant-se un antigen comú (antigen P) i un grup d'almenys 8 més (137). Murphy i Apicella (138) han demostrat que la composició diferent de les proteïnes externes de la membrana i lipopolisacàrids de l' *Haemophilus influenzae* no encapsulat, comporta una resposta antigènica també diferent. En un model animal d'otitis mitja recurrent per *H. influenzae*, s'aconseguí evitar la reinfecció si els animals eren reinoculats amb la mateixa soca (139).

Groeneveld *et al* (140) en un estudi longitudinal, analitzen els esputs de 12

pacients amb MPOC al llarg de 3 anys. Observen que la composició de les proteïnes externes de membrana dels *H. influenzae* canvien lleugerament (només uns pocs amino àcids), però que aquests canvis indueix una resposta immunològica significativa si s'injecten en conills.

Localitzacions inaccessibles

Els gèrmens poden aconseguir burlar la resposta immunològica situant-se en localitzacions inaccessible, com el recobriment de microcolònies per un gel polisacàrid o bé situant-se entre les cèl·lules epitelials, fenomen conegut com endocitosi (123).

A continuació es detallen de forma esquemàtica quins són els diferents mecanismes de virulència dels gèrmens més freqüentment implicats en les aguditzacions dels pacients amb MPOC.

Taula 20. Factors de virulència dels bacteris causants d'infeccions en la MPOC

Factor	<i>H. influenzae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>M. catarrhalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Estimulació producció de moc	+	+	?	+
Cil.liotoxicitat	+	+	?	+
Proteases	+	?	?	+
Inhibició elastasa	?	+	?	+
Invasió epiteli	+	+	+	-
Fimbries	+	-	+	+
Adhesines (no fimbries)	+	+	?	+
Proteasa IgA	+	+	+	-

2.4 MICROBIOLOGIA DE LA COLONITZACIÓ I INFECCIÓ

Els microorganismes més freqüentment implicats en la colonització i infecció bronquial són *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*. Un segon grup inclouen els bacils gram negatius, sobretot *Pseudomonas aeruginosa*, virus respiratoris i els bacteris intracel·lulars com *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae*. En els cultius amb raspall protegit també s'aïllen un grup considerable de gèrmens que s'engloben com a microorganismes no potencialment patògens (MnPP). Aquests són els 3 apartats que s'exposen a continuació.

2.4.1 *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* , *Moraxella catarrhalis*

A/ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* no tipificable (123)

La pràctica totalitat d' *H. influenzae* aïllats del tracte respiratori no tenen càpsula i són denominats, per aquest motiu, com no tipificables. La seva capacitat patogènica és menor.

Colonització i adherència

Són comensals del tracte respiratori alt, trobant-se fins a _ dels adults sans. És el germen que més freqüentment es cultiva de les secrecions de pacients amb MPOC, i quan es practiquen cultius seriats, es poden trobar en la quasi totalitat de pacients en algun moment. En els estudis que han emprat el

raspall protegit s'ha determinat fins un 16,7% en fase estable. Expressen pili i altres adhesines, unint-se de forma específica al receptor GalNac 1-4Gal. Els bacteris s'adhereixen al moc abans que a l'epiteli lesionat, no podent unir-se a l'epiteli íntegre.

Antígens de superfície

La superfície de l'*H. influenzae* està composta de proteïnes de la membrana externa (PME), lipooligosacàrids (LOS) i fimbries. La membrana externa consisteix en una doble capa asimètrica que conté proteïnes inserides. La capa externa conté els LOS, una mol.lècula amb potents efectes biològics. La PME més important és la P2, arribant a representar fins el 50% del contingut proteic de la membrana externa. Petits canvis en la seva seqüència d'aminoàcids indueixen respostes immunes diferents, específiques de cada soca. La P6 és una lipoproteïna que no arriba al 5% del total de les proteïnes de la membrana externa i que expressa epitops en la superfície del bacteri íntacte. Es manté preservada en les diferents soques, tant a nivell proteic com d'ADN. El LOS és un important factor de virulència pels bacteris gram negatius no entèrics, incloent *H. influenza*, i alhora un potent estímul inflamatori. És un antígen major de superfície i demostra una extensa heterogeneïtat entre soques.

Resposta immune a H. influenzae no tipificable

Les infeccions del tracte respiratori representen un espectre que avarca des d'infeccions lleus mucoses fins formes més invasives, incloent la pneumònia. Els estudis que han utilitzat ELISA en sang i esput de pacients amb MPOC han demostrat que contenen abundants anticossos contra la majoria de les PME de les soques del propi pacient. Malgrat tot, els pacients es colonitzen i infecten per aquests *H. influenzae* no tipificats. Probablement existeixen epitops de superfície més rellevants

HAEMOPHILUS PARAINFLUENZAE:

Les espècies patògenes d' *Haemophilus* , a banda d'*Haemophilus influenzae* , inclouen *H. parainfluenzae*, *H. arophilus*, *H. paraprophilus* i *H. ducreyi*. D'elles, *H. parainfluenzae* és el més freqüent. Es distingeix d'*Haemophilus influenzae* pel fet de no requerir factor X (sols precisa del factor V) pel seu creixement. Forma part de la flora normal del tracte respiratori superior i la seva patogenicitat és baixa en comparació amb *Haemophilus influenzae*.

Les infeccions per *H. parainfluenza* són similars a les causades per *Haemophilus influenzae*: faringitis, epiglotitis, otitis mitja, abscess dental, pneumònia, septicèmia i endocarditis entre d'altres.

En una cohort de 150 pacients amb MPOC seguits durant 8 anys, s'observa com els aïllaments d'*H. parainfluenzae* en l'esput no varien durant les

exacerbacions respecte la fase d'estabilitat (35% versus 39%), com tampoc els títols serològics, concluint que no és un patògen associat a les exacerbacions de la MPOC {Smith, Golden, et al. 1976 ID: 457}. En un estudi retrospectiu que abarca el període de 1977 a 1986, es detecta com a partir de 1983 els aïllaments d'*H. parainfluenzae* en l'esput desapareixen, atribuint-se a una millor identificació del gèrmens {Davies & Maesen 1988 ID: 320}.

Dels 9 articles que empen el raspall protegit, sols s'identifica *H. parainfluenzae* en 10 aïllaments en la publicació de Fagon *et al* {Fagon, Chastre, *et al.* 1990 ID: 19} i 2 pacients amb carcinoma broncogènic en la de Cabello *et al* {Cabello, Torres, *et al.* 1997 ID: 5}.

B/ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE (123):

S. pneumoniae és la causa més freqüent de pneumònia adquirida en la comunitat i una causa important d'infecció invasiva en adults. En pacients amb MPOC és pot cultivar en l'esput tant en fase estable com aguditzada.

Colonització i adherència

S. pneumoniae és un comensal de la via aèria superior tant en nens a com en adults sans, amb una proporció que varia entre 15-50%. Els pacients amb MPOC estan colonitzats per pneumococ amb més proporció que els subjectes sans. A nivell bronquial s'ha aïllat un 20,3% utilitzant el raspall protegit en la MPOC en fase estable. *S. pneumoniae* s'adhereix a les cèl·lules

faringes humanes a partir de les adhesines de la superfície bacteriana amb glicoconjugats de l'epiteli bronquial (GlcNAc 1-3Gal o GalNAc 1-4Gal).

Estructura dels antigens de superfície

La superfície de *S. pneumoniae* està constituïda per la càpsula de polisacàrids i la paret cel·lular, formada aquesta, per peptidglicans, polisacàrids i proteïnes. La capa de peptidglicans és més gruixuda i més entrecreuada que la de l'*H. influenzae* no tipificable. En la seva superfície exposa àcid teicoic, àcid lipoteicoic i polisacàrid capsular.

Els diferents polisacàrids capsulars són antigènicament distingibles, permetent una classificació en 84 serotips, i tots ells constitueixen un factor de virulència. Els pneumococs no capsulats són avirulents. Els anticossos contra la càpsula desencadenen fagocitosi i confereixen una protecció tipus específica. Són un potent estimulador de la via alternativa del complement.

La paret cel·lular conté una capa de peptidglicans, que conté enllaços covalents amb àcid teicoic i àcid lipoteicoic, i alguna proteïna de superfície antigènicament activa com la proteïna de superfície A. Tots aquests components són un potent estimulador de la via alternativa del complement i de citocines dels monòcits (menys el factor de necrosi tumoral, característic de les infeccions per bacils gram negatiu).

Resposta immunitària

L'anàlisi dels trastorns que predisposen a la infecció pneumocòccica indiquen que la fagocitosi és essencial per a la protecció contra *S. pneumoniae*. Els anticossos contra la càpsula proporcionen el major grau de protecció contra la infecció invasiva, però no és dubtós el paper en la infecció mucosa (no invasiva). El paper dels anticossos contra els antigens no capsular és menys clar.

C/ MORAXELLA CATARRHALIS (123) :

Moraxella catarrhalis (abans *Neisseria catarrhalis* per la seva similitud en el Gram i la forma de les colònies), ocupa el tercer lloc com a patògen en les infeccions del tracte respiratori baix en pacients amb MPOC. Nogensmenys, fins a finals de 1970 era considerat un comensal de l'orofaringe. En l'actualitat existeixen evidències microbiològiques, serològiques i terapèutiques del seu potencial patògen (141).

Estructura dels antigens de superfície

La superfície de *Moraxella catarrhalis* està composta de fimbries, PsEM i LOS. Totes les soques expressen una proteïna de superfície denominada antigen P. Es detecten anticossos contra la proteïna P en la majoria de la població normal. Investigacions recents han aportat la presència de 8 PsEM, i al menys 3 d'elles expressarien determinants antigènics en la superfície del bacteri intacte. L'acció del LOS en la patogènesi de la infecció es desconeix. Encara

que les diferents soques tenen similar massa molecular, existeixen diferències antigèniques entre elles.

2.4.2 Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, virus respiratoris

A/ CHLAMYDIA PNEUMONIAE

C. pneumoniae és un patògen intracel·lular que es transmet d'home a home, amb una elevada seroprevalència (40-60%). Es causa d'infeccions en el tracte respiratori (sinusitis, faringitis, bronquitis i pneumònia) i darrerament se l'implicat també en l'ateromatosis i malaltia coronària. A igual que els virus té activitat ciliotòxica (142). No s'ha aïllat en l'orofaringe de pacients amb MPOC en les principals sèries publicades (58,71,143-145).

El diagnòstic s'obté en cultius cel·lulars i per amplificació gènica. Es pot confirmar per un augment dels títols d'anticossos, ja sigui per fixació del complement o per microimmunofluorescència. Existeixen 2 patrons, el de primoinfecció amb una elevació ràpida del test de fixació del complement i una resposta lenta del test de microimmunofluorescència, apareixent IgM a les 3 setmanes i IgG a les 6 setmanes; i el patró de reinfecció amb títols nuls o baixos de IgM i aparició més ràpida de la Ig G per microimmunofluorescència (146), però pràcticament no per fixació del complement.

En 5 series (58,71,143-145) amb un total de 350 pacients amb agudització de la seva MPOC, s'objectivitza que *C. pneumoniae* és l'únic patogen en un 7,7% (veure Taula 19). En pacients amb MPOC estable, la seroprevalència és igual que els controls (77% i 73%, respectivament)(145) o significativament superior (63% i 46% en l'estudi de Blasi *et al*(143) i 96% i 73% en l'estudi de Miyashita *et al* (144).

Taula 21. *Chlamydia pneumoniae* en la MPOC aguditzada

Autors	Nº total pacients	Nº total pacients amb serologia+	Nº pacients amb serologia + sense copatògens
Soler <i>et al</i>	38	7	5
Blasi <i>et al</i>	142	?	6
Mogulkoc <i>et al</i>	49	11	8
Miyashita <i>et al</i>	77	?	6
Beaty <i>et al</i>	44	?	2
TOTAL	350	18/ 87 (20%)	27 (7,7%)

B/ MYCOPLASMA PNEUMONIAE

M. pneumoniae és un bacteri sense paret, d'aparença filamentosa, que presenta en el seu extrem un receptor d'àcid neuràmic per adherir-se a les membranes cel·lulars de l'hoste. És causa de pneumònia en tots els grups d'edat, però sobretot en joves i sovint en forma epidèmica.

El diagnòstic es basa en la determinació per medi de fixació del complement d' anticossos sèrics en fase aguda i fase de convalescència. La seva quadruplicació serà diagnòstica, així com un títol de 1:128 en la fixació del complement. Una altra forma és la detecció per enzim immuno assaig en fase

sòlida o ELISA ,ja sigui amb gèrmens lisats o bé amb la proteïna d'adhesió P1 purificada. La presència de crioaglutinines a 1:32 és també diagnòstica.

S´ha descrit ocasionalment associat a exacerbacions de l'asma (147) i en pacients amb MPOC. En l'estudi de Buscho *et al* (148) s'evidencia que és el responsable únic de l'exacerbació de la MPOC en 4 de 166 episodis d'exacerbació (2,4%) no observant-se igual fenomen durant la remissió.

Altrament, en aquest estudi prospectiu (1964-68) s'observa com en les restants 15 seroconversions tenen lloc juntament amb virus respiratoris, distribuïts per igual en fase estable que aguditzada. En dos publicacions (58,143) en les que s'investiga la presència alhora de *C. Pneumoniae*, sols es diagnostica en 3 pacients d'un total de 191 (1,5%). En l'única investigació (71) etiològica de l'agudització de la MPOC que es basa amb el raspall protegit i alhora es recullen mostres per anàlisi serològica de *M. Pneumoniae* no se'n troba cap cas.

C/VIRUS RESPIRATORIS:

El virus implicats en la infecció respiratòria pertanyen al grup dels virus ADN (grup adenovirus, grup herpes virus) i als ARN (coronavirus, influenza A i B, parainfluenza i virus sincitial respiratori). El mecanisme patogènic pot ser per infecció primària (influenza, adenovirus), reinfecció (virus sincitial respiratori, coronavirus) o bé reactivació (adenovirus, CMV i herpes).

L'efecte citopàtic més rellevant té lloc en l'epiteli de les grans vies àrees, produint àrees ulcerades, pèrdua de cil.lis, displàsia i producció de moc. A nivell de petites vies, aquest procés es denomina bronquiolitis i condiciona una

obstrucció al flux aeri (149). En el decurs de la infecció vírica pot tenir lloc una sobreinfecció bacteriana per diversos mecanismes: els bacteris s'adhereixen millor sobre les cèl·lules infectades, l'aclariment mucocil·liar queda alterat, però sobretot per una greu disfunció fagocítica (150).

Els pacients amb bronquitis crònica tenen més infeccions respiratòries d'origen víric, tal com es demostrà en l'estudi longitudinal de la població de Tecumseh (151), amb especial susceptibilitat pels rinovirus (152). Alhora, en una revisió d'infeccions respiratòries per dos virus realitzada per Drews *et al* (153) es calcula que el 58% dels pacients pateix alguna malaltia pulmonar crònica. En la cohort de Buscho *et al* (148), un 30% de les exacerbacions de 46 pacients amb bronquitis crònica, eren imputables a l'acció de virus i *M. Pneumoniae* (dades conjuntes), però també es detectava fins un 27,5% durant les fases de remissió. L'anàlisi pormenoritzada dels agents vírics tampoc aporta diferències significatives, excepte per Influenza A i Coronavirus OCA3, que són més freqüents en les exacerbacions. En l'estudi de la cohort de Smith *et al* (154), formada per 120 pacients amb MPOC i 30 no obstructius seguits durant 8 anys, s'obté que un 20% de les exacerbacions són imputables als virus respiratoris, sobretot rinovirus i influenza; mentre que sols un 6% té lloc en fase d'estabilitat. Gump i col·laboradors (155) troben un 34% de les 116 aguditzacions relacionades amb virus respiratoris. L'únic treball que conjuga raspall protegit en MPOC aguditzada i serologies per virus és el de Soler *et al* (71). En aquesta sèrie de 38 pacients, es registren 6 serologies positives, 5 Influenza virus i 1 virus sincitial respiratori. Dels 5 casos, en 3 s'aïllen gèrmens

potencialment patògens, pel que el percentatge final atribuït sols a virus es redueix a $4/38 = 10,5\%$.

2.4.3 Microorganismes no potencialment patògens (MnPP)

En totes les publicacions en les que s'ha emprat el raspall protegit en l'estudi de la població bacteriana en pacients amb MPOC, es descriu la presència de microorganismes que s'etiqueten com a potencialment no patògens, per a diferenciar-los dels potencialment patògens. Aquests descriptors reflecteixen certa reserva del paper últim de la patogenicitat de tots aquests gèrmens en la MPOC. De fet, *Moraxella catarrhalis* fou considerada com a comensal de la via aèria superior per la seva similitud amb *Neisseria*, i no ha estat fins els darrers 20 anys en que se l'ha considerat com a veritable patogen en les exacerbacions de la MPOC. Ambtot, alguns textos de referència en la Pneumologia (156) encara no l'inclouen com a patogen. La interpretació d'altres concentracions del MnPP en un pacient exacerbat o bé de MPP en fase d'estabilitat clínica encara no tenen respostes definitives. Fagon *et al* (91) consideren que tots els gèrmens aïllats en una agudització s'han de considerar responsables. Els percentatges de MnPP com a únic patogen varia entre un 6 i un 20% (veure taula 22).

Taula 22. MnPP com a responsable de l'exacerbació de la MPOC

Autors	Nº total de pacients estudiats	Nº de pacients amb cultiu positiu (sense punt de tall)	Nº de pacients amb MnPP com a únic germen (% respecte el total)
Monsó <i>et al</i>	29	19	2 (6,8%)
Soler <i>et al</i>	50	(Mínim 23)	8 (16%)
Martinez <i>et al</i>	20	18	4 (20%)

L'anàlisi percentual de tots els MnPP aïllats per raspall protegit en diferents situacions clíniques (sans, MPOC estable i MPOC aguditzat), mostra com aquests predominen sobre els MPP en els subjectes sans, quasi s'equiparen en la MPOC estable i finalment són superats en la MPOC aguditzada. Quan es quantifiquen els aïllaments en les tres situacions clíniques mencionades, la gran majoria es trobaria entre 10^1 - 10^3 UFC/ml, a diferència dels MPP que la gran majoria presenta concentracions entre 10^2 - 10^4 UFC/ml.

Individualització del microorganismes no potencialment patògens en les diferents situacions clíniques

A continuació es presenten les dades dels diferents MnPP en subjectes sans, MPOC estable i MPOC aguditzada, amb les respectives concentracions. Els articles consultats pel grup dels sans són els de Zalacain *et al* (89), Pollock *et al* (82), Cabello *et al* (65), Riise *et al* (85) i Kirkpatrick *et al* (64).

Taula 23. N° d'aïllaments de microorganismes no potencialment patògens (MnPP) en subjectes sans

Autors	Gèrmens	N°	UFC/ml
Zalacain <i>et al</i>	<i>S.viridans</i>	1	2×10^2
Pollock <i>et al</i>	<i>S.viridans</i>	2	10^3
Cabello <i>et al</i>	<i>S.viridans</i>	3	10^1
	<i>S. viridans</i>	1	2×10^2
	<i>Streptococcus</i> grup D	1	5×10^2
Riise <i>et al</i>	Estreptococ -hemolític	6	Tots $< 10^3$
	Estafilococ coagulasa (-)	3	
Kirkpratick <i>et al</i>	Estreptococ -hemolític	1	3×10^1
	<i>Neisseria</i> spp.	1	2×10^1
	<i>B. melaninogenicus</i>	1	7×10^1
	<i>Veillonella</i>	1	$2,5 \times 10^1$

Per la MPOC estable s'ha emprat les referències següents: Monsó *et al* (2) Zalacáin *et al* (87,89), Cabello *et al* (65) , Riise *et al* (85)

Taula 24. N° d'aïllaments de microorganismes no potencialment patògens (MnPP) en MPOC estable

Autors	Gèrmens	N°	UFC/ml
Monso <i>et al</i>	<i>Neisseria</i> spp	1	Tots a $< 10^3$
	<i>S. viridans</i>	2	
	<i>Corynebacterium</i> spp	1	
Zalacáin <i>et al</i>	<i>S. viridans</i>	3	10^3
	<i>Neisseria</i> spp	1	10^2
Cabello <i>et al</i>	<i>S. viridans</i>	11	$< 10^2$ tots $> 10^2$
	<i>S. viridans</i>	1	
	Estafilococ coagulasa (-)	2	
	<i>Neisseria</i> spp	6	
	<i>Corynebacterium</i> spp	2	
	<i>Candida</i> spp	1	
Riise <i>et al</i>	Estreptococ -hemolític	11	$< 10^3$
	Estreptococ -hemolític	5	$> 10^3$
	Estafilococ coagulasa (-)	2	$< 10^3$
	Estafilococ coagulasa (-)	1	$> 10^3$
Zalacáin <i>et al</i>	<i>S. viridans</i>	10	$> 10^3$
	<i>S. viridans</i>	4	10^2
	<i>S. viridans</i>	2	10^1
	<i>Neisseria</i> spp	2	10^2
	<i>Neisseria</i> spp	1	10^1
	Estafilococ coagulasa (-)	2	$> 10^3$
	<i>Prevotella melaninogenicus</i>	1	$> 10^3$
	<i>Peptostreptococcus anaerobuis</i>	1	$> 10^3$
	<i>Streptococcus sanguis II</i>	1	$> 10^3$

El càlcul de la presència de MnPP en la MPOC aguditzada s'ha basat en les publicacions de Fagon *et al* (91), Martinez *et al* (86), Monsó *et al* (2), Zalacain *et al* (87) i Soler *et al* (71).

Taula 25. N° d'aïllaments de microorganismes no potencialment patògens (MnPP) en MPOC aguditzada

Autors	Gèrmens	N°	UFC/ml
Fagon <i>et al</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	2	10 ²
	<i>Proteus mirabilis</i>	1	10 ⁴
	<i>Corynebacterium spp</i>	1	10 ⁵
	Estreptococs (no <i>S. pneumoniae</i>)	2	10 ²
		2	10 ⁴
Martinez <i>et al</i>	<i>S. viridans</i>	12	Tots < 10 ³
	<i>Neisseria spp</i>	5	
	Estafilococs coagulasa (-)	1	
	<i>S. agalacties</i>	1	
	<i>P. mulocida</i>	1	
Soler <i>et al</i>	<i>S. viridans</i>	8	> 10 ²
	<i>Streptococcus</i> grup F	1	> 10 ²
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	> 10 ²
	<i>Candida spp</i>	1	> 10 ²
	<i>S. viridans</i>	2	< 10 ²
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	< 10 ²
	<i>Neisseria spp</i>	1	< 10 ²
	<i>Corynebacterium spp</i>	1	< 10 ²
	<i>Candida spp</i>	1	< 10 ²
	Monsó <i>et al</i>	<i>S. viridans</i>	1
<i>Corynebacterium spp</i>		2	
Zalacain <i>et al</i>	<i>S. viridans</i>	1	10 ³
	<i>Neisseria spp</i>	1	10 ²
	<i>Corynebacterium spp</i>	1	5x10 ¹

A continuació s'exposen els gèrmens agrupats en les diferents situacions clíniques, en base als articles anteriorment mencionats.

Taula 26. Aïllaments de MnPP en subjectes sans, MPOC estable i aguditzada (Grup viridans junt)

	Subjectes sans (n=21)	MPOC estable (n=70)	MPOC aguditzada (n=64)
<i>S. viridans</i>	14 (66)	48 (68)	35 (54)
<i>Neisseria spp</i>	1 (4,7)	10 (14)	8 (12,5)
<i>Streptococcus grup D</i>	1 (4,7)	0	0
<i>Streptococcus agalactie</i>	0	0	1 (1,5)
<i>Peptostreptococcus</i>	0	1 (1,4)	0
<i>Staphilococcus epidermidis</i>	0	0	6 (9,3)
Estafilococ coagulasa (-)	3 (14)	7 (10)	1 (1,5)
<i>Corynebacterium</i>	0	2 (2,8)	6 (9,3)
<i>B. melaninogenicus</i>	1 (4,7)	0	0
<i>Prevotella melaninogenicus</i>	1 (4,7)	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	3 (4,6)
<i>Veilloonella</i>	1 (4,7)	0	0
<i>P. multocida</i>	0	0	1 (1,5)
<i>Candida spp</i>	0	1 (1,4)	4 (6,2)

Un cop agrupats els gèrmens que pertanyen al grup viridans, s'aprecia com presenta una lleu disminució en la MPOC aguditzada, a igual que Estafilococ coagulasa negatiu. En sentit contrari, *Neisseria spp*, *Candida spp* i *Corynebacterium*, augmenten discretament.

2.4.4 Poblacions polimicrobianes

Sols en 4 treballs és possible conèixer els resultats individuals de cada pacient i poder explotar les dades en quant a grau i combinacions de poblacions. Les publicacions utilitzades per aquesta anàlisi són: Monsó *et al* (2),

Zalacáin *et al* (89) ,(87) i Kirkpatrick&Bass (64), i els seus resultats s'expressen conjuntament en la següent taula.

Taula 27. Poblacions polimicrobianes

	Nº total pacients	Nº pacients amb cultiu +	Nº polimicrobians	Tipus de relació		
				P-P	P-nP	nP-nP
Subjectes sans	28	2	1 (50%)	-	-	1
MPOC estable	142	70	19 (27%)	6	5	8
MPOC aguditzada	41	29	4 (13%)	3	-	1

(P: patogen nP: no patogen)

Encara que les dades no permeten per una anàlisi exhaustiva, si que la tendència de la combinació en la MPOC estable és cap a la d'entre microorganismes no potencialment patògens, en la MPOC aguditzada, s'inclinaria cap a la combinació entre microorganismes potencialment patògens.

2.4.5 La flora orofaríngia en la MPOC

En l'estudi de Sachs *et al* (157) que inclou pacients amb asma (n=48) i MPOC (n=147) en fase estable i subjectes sans, es compara la flora orofaríngia a partir de rentats bucal i s'observa que sols hi ha diferències significatives amb *Staphylococcus aureus* ,estreptococ -hemolític i especies d'Enterobacteriacies. Els dos primers són presents en menys quantitat, mentre que els segons en més.

Sols es troben tres referències bibliogràfiques que facin referència al patró bacteriològic orofaringi obtingut per frotis respecte a l'obtingut per raspall protegit. En l'article de Cabello *et al* (65) s'analitzen 18 pacients amb MPOC estable. Els resultats que s'especifiquen són tractats com a conjunt global d'aïllaments orofaringis i conjunt global del aïllaments en el raspall protegit, observant-se una coincidència de microorganismes en un 58%, exclusivament per MnPP, no trobant-se cap coincidència pels MPP. En l'estudi de Soler *et al* (65), es correlacionen els resultats de 29 pacients amb MPOC aguditzada que requereixen ventilació mecànica. La correlació entre els cultius, prenent un punt de tall de 10^2 UFC/ml en el raspall protegit, és de $k=0,07$, que indica correlació aleatòria. En un abstract al Congrés de la SEPAR el 1996 (92), només 1 dels 8 cultius positius ($> 10^3$ UFC/ml) en el raspall protegit dels 31 pacients analitzats, hi ha coincidència amb el frotis faringi (12,5%).

2.5 EL PAPER DE LA INFECCIÓ EN L'AGUDITZACIÓ DE LA MPOC

La causa d'una exacerbació de la MPOC pot ser infecciosa (bacteriana o vírica) o bé no infecciosa (contaminació, tromboembolisme, farmacològic, incompliment medicació...). L'estratègia per a poder responsabilitzar l'acció bacteriana en l'exacerbació de la MPOC es basaria en: I) aïllar un/uns gèrmens amb un mètode fiable durant el quadre clínic compatible, II) demostrar que un tractament antibiòtic dirigit contra el germen en concret és eficaç i III) comprovar la resolució clínica i la negativització dels cultius amb el tractament prescrit.

2.5.1 Aïllament de bacteris durant les exacerbacions

Els mètodes més fiables per a l'obtenció de mostra per a cultiu bacterià són el raspall protegit i l'aspiració transtraqueal. Aquestes tècniques sols poden aplicar-se en estudis d'investigació en mostres reduïdes. Tal com s'ha comentat anteriorment, el 64% dels pacients amb MPOC aguditzada tipus I i II d'Anthonisen, presenten creixement bacterià en el raspall protegit. D'aquest percentatge un 39% correspon a MnPP i un 59% a MPP. Excloent els cultius polimicrobians, els MnPP es troben com a únic germen en els aïllaments del raspall protegit entre un 6 i un 20% dels casos estudiats. En l'únic article (71) que s'utilitza concomitantment el raspall protegit i la serologia per a virus, *M. Pneumoniae* i *C. Pneumoniae*, no és possible identificar si els pacients amb

creixement únic de MnPP tenien alguna serologia positiva. Si apliquem un punt de tall, llavors el 64% es rebaixa progressivament fins a un 13%, en cas de considerar el punt de tall de $> 10^5$ UFC/ml. En l'actualitat no existeix consens en quant a si s'ha d'aplicar algun punt de tall, i en aquest cas, quin. Les investigacions basades en l'aspirat transtraqueal no han utilitzat cap punt de tall (50).

Altres gèrmens bacterians en els que el seu diagnòstic és serològic, com *Chlamydia pneumoniae* o *Mycoplasma pneumoniae* es troben com a únic patogen en un 7,7% (veure taula 20) i 2% respectivament.

En total, s'aïllen bacteris en un 73% dels pacients amb MPOC aguditzada, si no prenen cap punt de tall ni distinció entre MPP i MnPP en els resultats del raspall protegit.

Les investigacions clíniques centrades en la relació entre virus i bacteris en la MPOC són limitades. Smith *et al* (158) seguiren una cohort de pacients durant 7 anys amb controls clínics i analítics bimensuals detectant que després d'una infecció per virus influenza, s'aïllava *Haemophilus influenzae* amb una freqüència doble de l'esperada estadísticament. En un 26% dels casos va haver una quadruplicació dels títols d'anticossos específics contra *Haemophilus influenzae* després d'una infecció per virus influenza. Així mateix, s'aïllaren 2,4 vegades més de *Streptococcus pneumoniae* en aquells pacients infectats amb virus influenza.

2.5.2 Eficàcia del tractament antibiòtic en les exacerbacions

Els assajos clínics de tractament antibiòtic s'han d'interpretar amb cautela ja que la majoria són empírics (159,160) o els que tenen una base microbiològica sols utilitzen el cultiu d'esput (161). Així mateix, sovint van dirigits a pacients amb bronquitis crònica però no sempre s'especifiquen els valors espiromètrics (160) (162). Pines *et al* publicaren el 1968 i 1972 dos assajos amb assignació aleatòria i amb grup control. El primer fa referència a exacerbacions greus i va haver de ser aturat perquè en el grup control es registraren 3 exitus de 15 pacients, mentre que cap en el grup tractat amb combinació de penicil·lina i estreptomina. Pel contrari, en el segon estudi, basat en 259 pacients amb exacerbació moderada, el grup antibiòtic (tetraciclina o cloramfenicol) no mostrà diferències significatives en quant a índex de recaigudes respecte el grup placebo. Nicotra *et al* conclouen el 1982 els resultats d'un assaig aleatoritzat, doble cec, amb tetraciclina versus placebo, en 40 pacients amb MPOC exacerbada que requerien ingrés hospitalari. Es conclou en que no hi ha diferències entre ambdós grups. Una anàlisi més profunda detecta que hi ha diferències significatives tant en el gradient alveolocapil·lar com en el pic de fluxos espiratoris. En l'article publicat a JAMA el 1987, Anthonissen *et al* (159) descriuen un assaig aleatoritzat i a doble-cec amb un de tres antibiòtics (amoxicil·lina, doxiciclina o co-trimoxazol) versus placebo en un total de 372 exacerbacions extrahospitalàries de 173 pacients amb MPOC moderada-greu amb una mitja de 1,3 exacerbacions per any, conclouent que sols hi ha benefici en un subgrup de pacients. Aquest és un dels mèrits de

l'estudi, doncs estratifiquen la presentació clínica en 3 grups: tipus I inclou pacients amb increment de la dispnea, expectoració i purulència de l'esput, tipus II sols presenten 2 de les 3 característiques anteriorment descrites i el tipus III sols presenten una dels tres criteris, en combinació amb d'altres símptomes (febre, odinofàgia...). En aquest estudi hi ha un possible biaix de l'investigador ja que en 35 de les 448 exacerbacions es considerà que el pacient estava greu i no entrà en el protocol. És presumible que aquests pacients rebessin tractament antibiòtic. Dels anys 90 cal destacar dos publicacions. Jorgensen *et al* (160) en un altre assaig clínic -amb 278 pacients bronquitics crònics amb agudització no complicada en la que es compara de forma aleatoritzada i a doble cec, placebo i amoxicil·lina- conclouen que no hi ha milloria clínica ni en el registre del pic de flux espiratori. Sachs *et al* (162) en un assaig a doble cec, amb un de dos antibiòtics (amoxicil·lina o co-trimoxazol) versus placebo en un grup de 71 pacients amb asma o MPOC en règim ambulatori, conclouen que no són eficaços. Nogensmenys, Sachs *et al* defineixen exacerbació simplement com un augment de la dispnea i no especifiquen el grau d'obstrucció ni l'edat dels pacients. Per d'altres paràmetres, com el nombre d'aguditzacions per any (0,6) o les característiques de l'esput (només un 27% de les exacerbacions presentaven esput mucopurulent), s'interpreta que presenten una menor afectació. Per tant, podrien ser pacients menys greus amb aguditzacions tipus I o II d'Anthonissen, les que efectivament no responen al tractament antibiòtic.

Les conclusions de tots aquests estudis no estan bàsicament contraposades sinó que més aviat es complementen. El tipus de pacients i el tipus d'exacerbacions són diferents.

La meta-anàlisi de Saint *et al* (163) sobre l'efecte dels antibiòtics en l'exacerbació de la MPOC es basa en 9 articles metodològicament similars (assignació aleatòria, doble cec i control amb placebo). En l'apartat anterior s'ha comentat els 4 publicats en les darreres 3 dècades. Aquesta meta-anàlisi conclou que l'efecte de l'antibiòtic és discretament beneficiós, amb una lleu milloria del pic del flux espiratori (10,75 L/min, 95% IC, de 4,9 a 16,5 L/min), però que pot ser suficient perquè els pacients més greus no entrin en insuficiència respiratòria.

En la pràctica clínica diària, la decisió d'iniciar tractament se cenyeix força a les conclusions de l'estudi d'Anthonisen: en un 7,5% de les exacerbacions del tipus I, un 33% del tipus II i un 64% del tipus III, respectivament, no s'inicià antibioticoteràpia en un estudi retrospectiu recentment publicat (38).

Més enllà de la presentació clínica, alguns autors (164)proposen classificar els pacients segons presentin més o menys condicions comòrbides: grau d'obstrucció, edat, tabaquisme, nº d'exacerbacions prèvies i altres malalties. Concretament, en quant a la correlació entre grau d'obstrucció i gèrmens aïllats, s'han publicat en el darrer any alguns articles (36) (71,89)que mostren com els bacils gram negatius estan més presents en pacients amb

FEV1% < 50%. Aquesta nova informació haurà d'incloure un canvi en la prescripció d'antibiòtics, aconseguint probablement un major nombre d'èxits terapèutics.

2.5.3 Negativització dels cultius després d'un tractament antibiòtic

No tots els cultius d'esput es negativitzen després d'un tractament antibiòtic amb bona resposta clínica. Es registren períodes de 9 ± 2 mesos per *Haemophilus influenzae* i de 10 ± 2 mesos per *Streptococcus pneumoniae* (132). Aquest fet reflecteix la persistència en la via aèria dels gèrmens en forma de colonització/portador. Dels grups que s'han basat en el raspall protegit, sols n'existeix un (71) que valori la resposta antibiòtica amb un segon cultiu. Dels 26 aïllaments ($> 10^2$ UFC/ml) en 19 pacients, s'erradicà un 77% dels mateixos - corresponent en la seva gran majoria a *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas maltophilia* - a les 72 hores d'haver iniciat el tractament.

2.6 PAPER DE LA INFECCIÓ EN EL DESENVOLUPAMENT DE MPOC I EVOLUCIÓ DE LA MATEIXA.

2.6.1 Evidència d'infecció bacteriana en els pacients amb MPOC estable

Les diferents sèries que han utilitzat el raspall protegit han evidenciat que existeix població bacteriana endobronquial en una proporció de fins un 55% en fase estable, si no s'aplica cap punt de tall. En la fase d'agudització el

percentatge arriba fins a un 64% i alhora augmenta la concentració bacteriana, passant l'índex bacterià de 4,2 a 5,5. Tots els gèrmens aïllats són habituals comensals de l'orofaringe. El disseny de tots els estudis és transversal, desconeixent, per tant, si la resta de pacients amb MPOC poden estar colonitzats en algun altre moment. També hi ha constància bibliogràfica de que els pacients amb MPOC tenen una seroprevalència més alta i nivells més alts d'anticossos contra *Chlamydia pneumoniae* (144).

S'ha propugnat que les infeccions respiratòries durant la infantesa eren un factor de risc per a desenvolupar MPOC en l'adult. En dos estudis retrospectius a Anglaterra i Gales s'afirma aquesta hipòtesi (165),(166) un cop ajustat el consum tabàquic. En un estudi prospectiu (167), una cohort de 801 nens són estudiats durant 13 anys, detectant que els que havien sofert infeccions respiratòries abans dels 2 anys i 2 o més episodis en algun any al llarg del seguiment, s'associava a una reducció del 20% en els fluxos mesoespiratoris. A banda dels estudis epidemiològics, Matsuse *et al*(168) exploren una possible patogènesi d'aquest fenomen, en analitzar el ADN de l'epiteli bronquial de fumadors i detectar incorporada una seqüència de la regió E1A de l'adenovirus, adquirit en la infància.

2.6.2 Efecte de les aguditzacions

El paper de les aguditzacions com a causa d'alteracions permanents o com accelerador del declini de la funció pulmonar encara no s'ha aclarit. En els dos únics estudis epidemiològics amplis en població amb MPOC els resultats són

contradictoris. Mentre que Bates (169) en un seguiment a 12 anys de 216 pacients no troba una correlació entre el nombre d'aguditzacions i les alteracions en l'espirometria, Kanner *et al* (170) en una cohort de 84 pacients seguits durant 4 anys sí que pot correlacionar el declini del FEV1 amb el nombre d'aguditzacions.

En un altre nivell d'estudi, algunes investigacions a nivell molecular mostren com després d'una agudització els marcadors d'inflamació poden tardar setmanes en normalitzar-se. Per exemple la interleucina-8 en l'esput (171) o bé l'ON exhalat (172). Els efectes a llarg termini encara no s'han determinat.

2.6.3 Evidència d'inflamació en la MPOC estable i aguditzada

a. Gammagrafia de leucòcits marcats amb Indi-111

Currie *et al* (173) demostren en un grup de 38 pacients amb MPOC estable (24 amb bronquièctasi i 14 sense bronquièctasi), que els leucòcits marcats amb Indi-111 i injectats en una vena perifèrica, emigren al pulmó amb més intensitat com més expectoració mucopurulenta presenta el pacient. A les 24 de la infusió del radiofàrmac, la totalitat dels pacients hipersecretors (> 20 ml/d) mostren una gammagrafia positiva, mentre que sols el 21% quan l'expectoració és < 5 ml/d. Aquesta associació té una correlació significativa de $r = 0,4$. La pèrdua de leucòcits marcats al 5-7è dia és el doble en el primer grup que en el segon.

b. Visió endoscòpica

L'Índex de Bronquitis (174), és una valoració semi-quantitativa de la inflamació bronquial basada en la inspecció visual durant la broncoscòpia flexible. És el sumatori de 4 paràmetres amb 4 graus (0-3) d'intensitat cada un. L'eritema, l'edema, les secrecions i la friabilitat són els paràmetres valorats. En subjectes normals és de $2,3 \pm 0,5$ mentre que en pacients amb MPOC és de $13,2 \pm 0,5$. Aquest índex té una correlació positiva ($r = 0,28$, $p < 0,015$) amb el percentatge de neutròfils en la fracció bronquial de la RBA.

c. Esput (induït)

L'esput induït en la MPOC a partir de la inhalació de sèrum salí hipertònic és un mètode segur i reproducible, amb poca variació entre investigadors. Aporta informació similar a la de la RBA, amb l'avantatge que és fàcilment repetible. En un article recent (37) es corrobora aquesta afirmació així com la presència de neutròfils en la MPOC ($74,9 \pm 4\%$) i la de macròfags en els subjectes sans ($74,0 \pm 4\%$). A igual que en la RBA, els marcadors d'activitat dels neutròfils estan elevats, tal com han demostrat Keatings *et al*, en dos publicacions consecutives (175,176). La mieloperoxidasa dels grànuls primaris i sobretot la lipocalina dels grànuls secundaris estan més elevats en la MPOC que en l'asma i en subjectes sans, de la mateixa manera que el factor de necrosi tumoral alfa i la interleucina-8.

d. Rentada broncoalveolar (RBA)

La RBA dels pacients amb MPOC en fase estable presenta un perfil cel·lular i d'activitat inflamatòria diferent als subjectes normals. Es comptabilitza un major nombre de cèl·lules ($6,1 \pm 2,2 \times 10^6$ versus $3,7 \pm 0,5 \times 10^6$, en normals) amb un increment de neutròfils: $35,8 \pm 5,6\%$, versus $10,3 \pm 5,6\%$ en normals (177). Els marcadors d'activitat de neutròfils, fibroblasts i eosinòfils estan incrementats, tal com reflecteixen els nivells de mieloperoxidasa (MPO) i interleucina-8 (IL-8), hialuran, i proteïna catiònica dels eosinòfils, respectivament (16). Similars resultats han estat publicats per altres grups, com Linden *et al* (178) També el factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags dels pacients amb MPOC presenta nivells superiors que els subjectes normals (179). Durant les exacerbacions augmenta de forma significativa el percentatge de neutròfils respecte l'estat basal ($83 \pm 18 \times 10^3$ i $10 \pm 3 \times 10^3$ cel/ml, respectivament), afegint-se també de forma significativa els eosinòfils ($6,7 \pm 1,9 \times 10^3$ i $1,9 \pm 1,9 \pm 0,5 \times 10^3$, respectivament)(179).Els nivells del factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags també varia de forma significativa respecte l'estat basal (54 ± 8 versus 25 ± 5 pg/ml, respectivament) (179).

e. Marcadors de la inflamació en l'aire exhalat: Òxid nítric (ON) i peròxid d'hidrogen (H₂O₂)

L' ON és un gas altament reactiu amb un temps de vida mitja de segons en els teixits vius, sintetitzat probablement en l'epiteli bronquial i amb diverses

funcions fisiològiques com: antimicrobià, citotòxic per a cèl·lules malignes, vasodil·latador, broncodil·latador per via neural, broncoconstrictor per l'edema bronquial, mediador de la inflamació aguda i crònica per a diversos mecanismes.

En un recent article, Corradi *et al* (180) determinen el ON exhalat de 20 pacients amb MPOC estable i 20 controls i observen com en el grup amb MPOC els valors estan significativament elevats i a més presentaven una correlació positiva amb el FEV₁ %. El subgrup de fumadors, tan amb MPOC com en sans, presentaven els nivells més baixos dins de cada grup. Agustí *et al* han descrit molt recentment com l'ON exhalat augmenta durant les exacerbacions de la MPOC, no millora amb la infusió de corticosteroides intravenosos, persisteix elevat durant mesos i sembla produir-se tant en via central com perifèrica (172)

El H₂O₂, que sense ser un radical lliure té una potent acció oxidant, forma part de les espècies reactives de l'oxigen. Aquestes estan generades majoritàriament pels neutròfils, ja siguin circulants o bé segrestats en la vasculatura pulmonar. La concentració de H₂O₂ en el condensat de l'aire espirat es considera el resultat net entre la producció i la seva neutralització pel sistema antioxidant. Una producció augmentada de H₂O₂ pot ser deguda per un augment de les cèl·lules inflamatòries del pulmó o bé per un augment de la seva producció. Dekhuijzen *et al* (181) han demostrat que en els pacients amb MPOC estable els nivells estan més elevats que en el grup de subjectes sans ($0,205 \pm 0,05 \mu\text{M}$ i $0,029 \pm 0,012 \mu\text{M}$, respectivament; $p < 0,05$) i que

augmenten de forma significativa durant les exacerbacions ($0,600 \pm 0,075 \mu\text{M}$, $p < 0,001$).

f. Marcadors de la inflamació en plasma

Els marcadors plasmàtics d'inflamació més habituals no han pogut trobar cap correlació amb el procés patològic del pulmó, l'òrgan diana. Si en canvi s'ha pogut quantificar marcadors indirectament relacionats amb la inflamació com l'activitat antioxidant. En models animals d'inflamació aguda a nivell pulmonar s'ha demostrat que el segrest de neutròfils alliberen espècies reactives d'oxigen (182). A partir del test amb Trolox, un anàleg de la vitamina E amb una elevada activitat antioxidant i els nivells dels productes de la peroxidació de lípids, Rahman *et al* (183) han demostrat que durant l'exacerbació de la MPOC els nivells plasmàtics d'antioxidants disminueixen i els productes de l'oxidació augmenten de forma significativa respecte la situació basal, recuperant els nivells un cop superada la descompensació.

Un altre marcador indirecte són les mol·lècules d'adhesió cel·lular. Aquestes causen l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli, abans de que passin cap al teixit diana. Riise *et al* (184) analitzen dos mol·lècules d'adhesió: la ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) i la selectina E. Ambdues estan elevades de forma significativa en els pacients amb MPOC estable, respecte el grup subjectes sans. La selectina-E es correlaciona de forma significativa respecte el FEV₁ i es troba igualment més elevada en aquells pacients amb colonització

bronquial significativa, expressada com a cultius bacterians obtinguts per raspall protegit.

g. Histologia

Els investigadors (185) que han basat els seus estudis en les biòpsies bronquials broncoscòpiques han demostrat que: 1) el gruix de la membrana basal és similar que en subjectes sans, 2) existeix una infiltració mononuclear de predomini dels limfòcits T (CD3+) i macròfags, en comparació amb els controls; amb predomini de la subpoblació de limfòcits CD8, 3) la infiltració mononuclear expressa receptors per a interleucina-2 i antígens d'activació molt tardana, fet que suggereix la presència de limfòcits T en diferents estadis d'activació i que indica una resposta immunològica en aquesta malaltia, 4) increment dels vasos que expressen les mol.lècules d'adhesió leucocitària endotelial tipus-1, mentre que no estan augmentats en nombre de vasos que expressen mol.lècules d'adhesió intercel·lular tipus 1, 5) durant l'exacerbació es produeix un augment de la població de neutròfils i d'eosinòfils però sense apreciar un increment de les cèl·lules que expressen la citocina interleucina-5, característica de l'activació eosinofílica de l'asma.

En peces quirúrgiques també es descriu una major infiltració de limfòcits CD8+ en la via perifèrica d'aquells fumadors que desenvolupen obstrucció respecte aquells que tenen un funcionalisme conservat (186).

El perquè existeix una dissociació entre la infiltració limfocitària del teixit i un acumul de neutròfils en la RBA i l'esput, podria explicar-se pel ràpid

trànsit dels neutròfils cap a la llum, pel que la visió puntual d'aquest flux no pot reflectir la seva magnitud (187). Una altra explicació radicaria en que aquesta infiltració limfocitària té predominantment lloc a nivell subepitelial, però estudis recents han evidenciat com existeix també presència de neutròfils en l'epiteli i en les glàndules bronquials(187,188).

2.6.4 La inflamació crònica com a causa de dany histològic

Genèricament, la inflamació crònica és un procés en el que hi ha un cicle continu de dany i reparació. De forma característica, el dany tissular acaba amb un infiltrat mononuclear, i com a conseqüència, en comptes d'una ràpida resolució i desaparició del procés inflamatori, té lloc un procés de reparació que implica una proliferació de petits vasos i fibroblasts, que acaba amb un dipòsit de col·làgena i cicatrització. Algunes malalties intestinals (gastritis crònica, malaltia celíaca o Malaltia de Crohn) o l'asma (189) són exemples de que la inflamació crònica d'una superfície mucosa es relaciona amb canvis histològics.

Una lesió aguda sobre una superfície mucosa , té la capacitat de d'auto recuperar-se ad integrum. Això és possible perquè existeix un recanvi epitelial continu, oferint l'oportunitat de reemplaçar i reparar la mucosa sense deixar un dany perllongat, a diferència d'altres teixits amb un recanvi cel·lular menys elevat que tendeixen a curar-se deixant cicatriu. En les superfícies mucoses, les cèl·lules que sobreviuen són capaces de migrar i proliferar, per tal d'omplir els buits deixats per la majoria de les lesions. En aquest procés de reparació estan implicats diferents processos: 1) activació de macròfags; 2) alliberament de

factors de creixement i citocines fibrogèniques; 3) activació de fibroblasts i miofibroblasts; 4) elastòlisi i elastosíntesi; 5) augment de la síntesi de col·làgena; 6) dipòsit de col·làgena i 7) augment de la síntesi i alliberament dels components de la matriu extracel·lular (190).

Les cèl·lules epitelials en procés de reparació expressen un conjunt diferent de mol·lècules de superfície. El factor de creixement transformador (TGF- β) és considerada la citocina fibrinogènica més important que intervé en el remodelament. A banda de ser generades per l'epiteli, pot ser també sintetitzat per macròfags, fibroblasts i eosinòfils. En les biòpsies bronquials la seva immunoreactivitat estava altament incrementada en l'epiteli i submucosa dels pacients amb bronquitis crònica però no en asmàtics (191). També s'ha comprovat que augmenta l'expressió de les integrines epitelials així com incrementa la fibronectina (192), la qual permet l'adherència de bacteris com *Staphiloccocus aureus* (193) i *Pseudomonas aeruginosa* (194).

El dipòsit de components de la matriu extracel·lular en la paret de les vies respiratòries en fumadors pot ocórrer independent a la gènesi d'emfisema (195). En la publicació de Cosio *et al* (196) s'estableix que la lesió inicial en la petita via aèria és de tipus inflamatori que progressa a fibrosi amb dipòsit de teixit connectiu. Així mateix, el grau d'obstrucció no es correlaciona amb la inflamació sinó amb la fibrosi, la metaplàsia de cèl·lules calicilars i escamoses, juntament amb la hiperplàsia de múscul llis. Des d'un altre punt de vista, un estudi que correlaciona obstrucció pulmonar i grau d'emfisema per TAC d'alta

resolució conclou que l'emfisema té una escassa contribució en la limitació al flux aeri (197).

Els factors que finalment determinen si es restaurarà l'arquitectura normal o bé si es desenvoluparà fibrosi peribronquial i obstrucció al flux aeri estan encara per a definir.

2.6.5 La infecció bacteriana en la inflamació crònica de la via aèria.

“Hipòtesi del cercle viciós”

Els estudis de les infeccions pulmonars han demostrat que hi ha una estreta relació entre la càrrega bacteriana i el reclutament de neutròfils (198) així com la càrrega bacteriana i els mediadors de la inflamació (IL-8) en la fase sol de l'esput. També s'ha suggerit que els neutròfils juguen un paper important en la patogènesi de les malalties pulmonars cròniques, degut a la seva habilitat d'alliberar una varietat d'oxidants i enzims proteolítics capaços de causar dany pulmonar agut i crònic (199).

Cole i Wilson (200) hipotetitzen que en aquells individus amb els que les defenses de primera línia estan alterades (per exemple, clearance mucociliar disfuncionant i augment de la producció de moc) és possible una adherència prolongada de bacteris que inicien un “cercle viciós” ja que la resposta de l'hoste contra aquests no és completament efectiva. Tot el contrari, els mediadors inflamatoris provoquen un dany tissular sobre el qual els bacteris poden continuar sobrevisquent i alhora estimulants el sistema de defensa de l'hoste conduint, finalment, a la formació d'un teixit crònicament inflamat.

Aquesta hipòtesi està recolzada per un model experimental de bronquièctasi en la rata, pel qual l'evolució de les mateixes precisa de la persistència de microorganismes viables (201).

Els factors quimiotàctics dels neutròfils estan generats pels bacteris però sobretot pel mateix epitel·li (202). Diferents grups han demostrat com l'epitel·li bronquial humà és capaç d'expressar i generar citocines específiques com la IL-6, IL-8, el factor de necrosi tumoral i mol·lècules d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1) (203,204).

Però no tots els bacteris són capaços d'induir la mateixa resposta inflamatòria. En un article pendent de publicar, Soler *et al* demostren com tant el nombre de neutròfils com la IL-8 i factor de necrosi tumoral- en la RBA estan significativament més elevats en pacients amb MPOC infectats amb MPP respecte els controls i els pacients amb MPOC sense població de MPP en els cultius de raspall protegit i RBA.

2.7 EFECTES DEL TABAQUISME SOBRE LA VIA AÈRIA

El fum del tabac està format per nombroses mol.lècules en fase gasosa i en partícules. Les conseqüències nocives sobre l'organisme són múltiples i depenen de diferents compostos. No tots els tabacs comercialitzats indueixen els mateixos símptomes. En un ampli estudi (205) en més de 1000 subjectes al Brasil s'estableix que els símptomes respiratoris es presenten més freqüentment en els fumadors de tabac de fulla de blat de moro. Aquestes conclusions no es contraposen amb un article previ derivat de l'estudi epidemiològic de Tucson (27), en que es determina que no hi relació entre presentar símptomes de bronquitis crònica i el contingut de nicotina, monòxid d carbó i quitrà.

El tabaquisme constitueix la principal causa d'obstrucció al flux aeri, però encara no s'ha pogut determinar quins són els fumadors susceptibles dels que no. S'ha descrit més infiltració de les petites vies aèries per limfòcits T CD8⁺ així com un increment en l'àrea de múscul llis en aquells amb obstrucció i símptomes de bronquitis crònica (186). També s'ha publicat que l'òxid nítric exhalat és menor en fumadors asimptomàtics d'aquells amb obstrucció al flux aeri, interpretant-se que el fum lesiona les cèl·lules productores d'òxid nítric (180). Es precisen de més investigacions a nivell mol.lecular i genètic per aclarir aquest aspecte.

Un grup de substàncies que té relació directa amb el desenvolupament de la MPOC és el constituït pels oxidants. Els òxids de nitrogen, carbó i cadmi,

els àcids cianhídric i fòrmic , així com tots els radicals tòxics de l'oxigen poden oxidar la metionina del sistema -1-protesa inhibidor, i convertir-lo en inoperant. Aquest mecanisme estaria implicat en la gènesi de l'emfisema. Recentment s'ha publicat (206) l'existència d'endotoxina bacteriana (lipopolisacàrid) bioactiva en el fum del tabac. Aquesta endotoxina resistiria la combustió en una mínima part (1%), però la seva alta potència inflamatòria i les repetides inhalacions al llarg del dia provocaria que aquells fumadors susceptibles presentessin inflamació bronquial , expressada com a hipersecreció i tos diària.

Els efectes del tabaquisme sobre la via aèria són múltiples:

A/ Epiteli: Els cil·lis presenten diverses alteracions tant a nivell ultraestructural com funcional que els fan ineficaços (113,114). Existeix una pèrdua de cèl·lules cil·liades i un augment de cèl·lules calicilars, determinat per esput (105,207), raspall citològic (106) o primera fracció de RBA (62). L'epiteli pseudoestratificat es transforma en no cil·liat i fins i tot presentar metaplàsia escamosa. La hipersecreció mucosa per hiperplàsia de les glàndules submucoses i la diferent composició del moc (109), juntament amb les alteracions abans descrites, enlenteixen l'aclariment de la secreció traqueobronquial (99) (24).

B/ Immunitat: La resposta immunitària i cel·lular està alterada pel tabaquisme (208). Les immunoglobulines plasmàtiques IgG i IgA estan reduïdes, mentre que les subclasses IgG1 i IgG3 estan augmentades a nivell

pulmonar. El recompte de macròfags , neutròfils i limfòcits perifèrics està augmentat, però la seva repercussió última sobre la defensa de l'hoste no està del tot determinada.

C/ Adherència bacteriana: L'adherència bacteriana de *Streptococcus pneumoniae* a l'epiteli orofaringi està augmentada en els fumadors respecte als no fumadors (17,209), encara que no s'ha pogut determinar diferències significatives per *Haemophilus influenzae*.

Tots aquests factors en conjunt, afavoreixen que els fumadors actius amb MPOC estable, siguin susceptibles d'estar colonitzats, tal com demostrà Irwin *et al* (50) utilitzant l'aspirat transtraqueal ($p=0,015$), o més recentment Zalacaín *et al* (89) basant-se en els resultats del raspall protegit (OR 3,17; 95% ,IC 2,5-8).

3. OBJECTIUS

3.1 Validar la tècnica del raspall protegit en l'estudi de la població bacteriana de la MPOC.

El raspall protegit s'introduí pel diagnòstic de pneumònia i diverses investigacions independents, sobretot en pacients sotmesos a ventilació mecànica, han demostrat la seva validesa i reproductibilitat. Des de les primeres publicacions que han emprat el raspall protegit pel cultiu de secrecions en l'arbre bronquial no s'ha plantejat aquesta qüestió. Per tal d'aportar dades sobre aquest aspecte s'ha cultivat un grup de pacients ambulatoris amb 2 raspalls protegits.

3.2 Conèixer els factors de risc per a la colonització en pacients amb bronquitis crònica estable utilitzant el raspall protegit.

Mentre que s'ha descrit quins són els factors de risc per a la colonització bacteriana basats en el cultiu d'esput, cap de les publicacions que han emprat el raspall protegit han plantejat aquesta qüestió. S'ha practicat una anàlisi multivariant dels factors de risc en la població cultivada amb el raspall protegit.

3.3 Esbrinar la intervenció de la població bacteriana estudiada a partir del raspall protegit en les exacerbacions de la MPOC en comparació a la fase estable.

Cap de les publicacions anteriors estudia de forma comparativa pacients amb MPOC estable i aguditzada. S'han cultivat 2 poblacions ambulatories equiparables en quant a dades antropomètriques i de funció respiratòria.

4. PUBLICACIONS

4.1 ESTUDI I

Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis

Monso,E.; Rosell,A.; Bonet,G.; Manterola,J.; Cardona,P.J.; Ruiz,J.; Morera,J.

Eur. Respir J 1999; 13:338-42.

L'objectiu d'aquesta publicació és determinar els factors de risc per a la colonització bacteriana en 41 pacients amb bronquitis crònica. Onze d'ells tenen funció normal mentre que 25 presenten una obstrucció lleugera/moderada (FEV1 % de 74 ± 23). A banda d'analitzar els factors de risc a partir d'un model de regressió logística amb les variables d'edat, tabaquisme i funció pulmonar, es presenta per primer cop en la literatura les dades de repetibilitat de la tècnica en pacients sense pneumònia. El punt de tall es 10^3 UFC/ml, obtenint-se creixement significatiu en 9 (22%) amb 13 aïllaments. Els resultats microbiològics aportats són: *Haemophilus influenzae* 5 (38%), *Streptococcus viridans* 3 (23%), *Streptococcus pneumoniae* 2 (15%), *Proteus mirabilis* 1 (7,6%), *Neisseria* spp. 1 (7,6%), *Corynebacterium* spp. 1 (7,6%). Les combinacions polimicrobianes corresponen a: *Haemophilus influenzae* +

Streptococcus pneumoniae en dos pacients, *Proteus mirabilis* + *Streptococcus viridans* i *Streptococcus viridans* + *Corynebacterium* spp. Per sota del punt de tall es troben 4 creixements en 3 pacients: 1 *Streptococcus viridans* a 10^2 UFC/ml i amb 10^1 UFC/ml : *Neisseria* spp + *Streptococcus viridans* i *Streptococcus viridans*. El model de regressió logística mostra que la colonització bronquial s'associa amb el tabaquisme, amb una odds ratio de 9,83 (interval de confiança 1,16-83,20). En un subgrup de 18 pacients es repeteix l'obtenció de mostra microbiològica, obtenint una concordança qualitativa en un 72,2%, mentre que la repetibilitat quantitativa disminueix fins a 47,4%.

4.2 ESTUDI II

Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush

Monso,E.; Ruiz,J.; Rosell,A.; Manterola,J.; Fiz,J.; Morera,J.; Ausina,V.

American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine

1995;152:1316-20.

S'investiga la composició de la població bacteriana endobronquial per medi del raspall protegit en un total de 69 subjectes. El grau d'obstrucció (FEV₁ %) é de 51 ± 23 pels estables i 43 ± 14 pels aguditzats. S'estableix el punt de tall a 10^3 UFC/ml. Els resultats en el grup de 40 pacients amb MPOC estable són: 27 negatius, 13 aïllaments significatius (3 polimicrobians), 5 aïllaments amb concentracions $< 10^3$ UFC/ml (2 polimicrobians); el que significa que un 25% (10/40) de la mostra està colonitzada. En el grup de 29 pacients exacerbats: 10 negatius, 17 aïllaments (2 polimicrobians), 5 aïllaments amb concentracions $< 10^3$ UFC/ml (1 polimicrobià); el que significa que un 51% (15/29) de la mostra està infectada. Quant els gèrmens amb creixement significatiu, els resultats s'expressen a continuació. En el grup de MPOC estable (13 aïllaments): *Haemophilus influenzae* 6 (60%), *Streptococcus pneumoniae* 3

(30%), *Moraxella catarrhalis* 1 (10%), *Staphylococcus aureus* 1 (10%), *Pseudomonas aeruginosa* 1 (10%) i *Acinetobacter* spp. 1 (10%). Els cultius polimicrobians són: 2 casos d' *Haemophilus influenzae* amb *Streptococcus pneumoniae* i un tercer d' *Haemophilus influenzae* amb *Moraxella catarrhalis*. En el grup amb MPOC exacerbada (17 aïllaments): *Haemophilus influenzae* 10 (58%), *Streptococcus pneumoniae* 3 (17%), *Pseudomonas aeruginosa* 2 (12%) i *Moraxella catarrhalis* 2 (12%). Les combinacions són: *Haemophilus influenzae* + *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae* + *Moraxella catarrhalis*. Dos pacients (5%) del grup dels estables i 7 (24%) del exacerbats presenten una càrrega bacteriana superior (10^4 UFC/ml), evidenciant que en pujar el punt de tall les diferències entre grups es fan més evidents.

5. LIMITACIONS I BIAIXOS DELS ESTUDIS

5.1 MOSTRA I VARIABLES

El tipus de mostra poblacional cultivada pot presentar un biaix per les indicacions i contraindicacions derivades de la pròpia exploració broncoscòpica. En els pacients estables, hi havia una indicació formal per a la broncoscòpia com l'estudi d'un nòdul pulmonar, tos persistent, sospita d'estenosi de via alta o una hemoptisi no activa. Malgrat que foren eliminats aquells amb troballes broncoscòpiques significatives o en les tècniques citològiques o microbiològiques de rutina, desconeixem l'evolució final de la majoria d'ells.

El nombre de pacients inclosos en l'estudi dels factors de risc no avarca tot el ventall de graus d'obstrucció, doncs no hi ha pacients amb obstrucció greu. Altres variables que podrien estar afectant la presència de microorganismes, com l'estat immunitari (sistèmic o local) o la presència de bronquièctasi en una TAC d'alta resolució tampoc s'analitzen.

En el grup de pacients amb MPOC aguditzada no s'inclouen altres opcions etiològiques (virus, *Mycoplasma pneumoniae* o *Chlamydia pneumoniae*). Així mateix, es restringeix l'estudi a aquells pacients amb un determinat tipus d'exacerbació (tipus 1 o 2 d'Anthonisen).

5.2 TÈCNICA

Malgrat s'ha pogut demostrar que el raspall protegit en el context de la MPOC té una bona reproductibilitat i escassíssima contaminació, desconeixem si és un gold-standard. O si existís un gold-standar quina relació s'establiria amb ell.

El punt de tall és un factor limitant alhora d'analitzar els resultats. Mentre hi ha ampli consens en la pneumònia, encara no existeix cap estudi definitiu per la infecció bronquial. El nostre grup ha utilitzat 10^3 UFC/ml, però si s'estableix un punt de tall més baix, o bé s'elimina, la proporció de cultius positius augmenta.

El raspall, un cop obtinguda la mostra de secreció bronquial, es diposita en sèrum fisiològic o bé Ringer lactat, el qual podria ser tòxic per algunes espècies bacterianes. Convindria també un control citològic rutinari (cèl·lules bronquials, macròfags, polimorfonuclears, cèl·lules escamoses) per eliminar la mínima possibilitat de contaminació.

La mostra que s'obté amb el raspall prové d'una àrea aproximada d'entre 2 i 4 cm² i podria no ser representativa de tot el territori bronquial. Encara no es coneix quin és el mapa microbiològic en la MPOC: si hi ha una distribució homogènia o bé focal, si conviuen diverses espècies o bé n'hi ha una de dominant.

5.3 TIPUS D'ESTUDI

Ambdós estudis presentats són de tipus transversal. Aquest disseny no afectaria en l'anàlisi de la població amb MPOC estable si es pressuposa que la població bacteriana és alhora estable i de distribució uniforme. Si pel contrari, la presència bacteriana fos focal o bé fluctuant, podríem estar induint a una divisió de la mostra entre els colonitzats i els no colonitzats que no respondria a una situació del tot representativa. Un estudi longitudinal podria aclarir aquest aspecte. En el cas dels aguditzats, l'absència d'un seguiment bacteriològic en els casos de cultiu positiu, ens priva de conèixer la resposta al tractament antibiòtic, fet que proporcionaria informació addicional sobre el paper etiològic del bacteri aïllat.

6. DISCUSSIÓ

L'obtenció de mostra de secreció bronquial amb el raspall protegit utilitzant el broncoscopi flexible, és una tècnica òptima per a l'estudi dels bacteris de la via aèria dels pacients amb MPOC no ventilats mecànicament. Aquesta tècnica aconsegueix estar pràcticament exempta de contaminació orofaríngia, objectiu principal per l'estudi microbiològic endobronquial.

Aquesta afirmació es basa en la presència d'un patró bacterià endobronquial diferent en subjectes normal (prevalença d'un 27% sense punt de tall, amb un índex bacterià de 2,2 i amb una població potencialment patògena del 6%) respecte el dels subjectes amb MPOC estable (prevalença d'un 55% sense punt de tall, amb un índex bacterià de 4,2 i un 41% de població potencialment patògena), mentre que els estudis comparatius de la flora orofaríngia entre sans i pacients amb MPOC no mostren diferències significatives en quant a la distribució de gèrmens potencialment patògens(157). A més, els pocs estudis que han directament estudiat la relació entre flora orofaríngia i raspall protegit han demostrat una nul·la correlació(71) o com a màxim una coincidència d'un 12,5%. Finalment, en els pacients estables en els que s'ha practicat un control citològic de les mostres obtingudes sols s'ha detectat presència de cèl·lules orofaríngies en un 3,7%(89).

La tècnica presenta així mateix una reproductibilitat quantitativa d'un 72,2%, que s'acosta al 80-90% que es descriu per pneumònia en pacients ventilats, descrivint-se, però una més baixa reproductibilitat qualitativa. Desconeixem, però si la població bacteriana és totalment homogènia dins de l'arbre bronquial o bé si pel contrari podem trobar-nos àrees polimicrobianes i amb concentracions diferents. El fet de trobar un 23% de cultius polimicrobians en els pacients amb MPOC fa pensar que no és improbable que puguin estar convisquent més d'una població bacteriana.

Sobre el punt de tall no existeix encara consens. Si considerem que la contaminació és pràcticament nul·la, no crec que el punt de tall hagi de ser utilitzada en aquest sentit. En els articles presentats s'ha utilitzat 10^3 UFC/ml. Si s'hagués optat per un punt de tall més baix el percentatge final variaria fins a un 15% de més, en el cas extrem de prendre tots els cultius amb creixement com a positius. Si es contempla el conjunt de totes les series publicades, la positivitat del cultiu en funció del punt de tall proporciona diferents percentatges; per exemple, en la MPOC estable es pot passar d'un 55% quan es considera $< 10^2$ UFC/ml fins a un 7,4% si prenem 10^4 UFC/ml (Figura 7).

Pot ser caldria aplicar una visió més dinàmica, com la que proposa Baker *et al* (97) en la que considera "l'índex bacterià" com la dada sobre la que es pivotaria la decisió (i que amb més d'un 20% de cultius polimicrobians pot reflectir millor la càrrega bacteriana), juntament amb la impressió clínica d'infecció o no, i la valoració risc/benefici d'iniciar antibioticoteràpia. Amb el concurs d'aquestes tres variables s'obté un ventall més ampli. Però aquesta valoració només té sentit en el context d'una agudització i no pot extrapolar-se als resultats dels pacients amb estabilitat clínica. És per això que el significat clínic últim hauria d'anar suportat amb informació sobre la resposta de l'hoste en front al germen aïllat. Si el germen no aconseguís desencadenar cap tipus de resposta, llavors se'l pot considerar clínicament irrellevant; pel contrari, si es detectessin marcadors d'un resposta immunològica aguda, local i específica o bé mediadors de la inflamació in situ podríem considerar-los agents clínicament rellevants.

L'esput no és una mostra tan òptima com el raspall protegit ja que conté, indefugiblement, contaminació orofaríngia. Abans de la instauració del raspall protegit, Irwing *et al*(50) ja comparen els bacteris aïllats en l'aspirat transtraqueal amb l'esput de pacients amb MPOC estable i conclouen que l'esput aporta un 67% de falsos positius. En els 4 únics treballs en els que es cultiva simultàniament esput i raspall protegit, encara que corresponen a situacions diverses, la coincidència entre ambdós mètodes és baixa, oscil·lant entre 15 i 43%, tot i comptabilitzant també aquells cultius parcialment coincidents.

Nogensmenys, la freqüència dels gèrmens aïllats obtinguda del conjunt d'estudis que han emprat el raspall protegit i aquells que han utilitzat l'esput aporten informació no discordant. En la situació d'agudització de la MPOC, el 1^e i 2^{on} gèrmens potencialment patògens més freqüentment aïllats han estat els mateixos: *Haemophilus influenzae* (48% amb raspall protegit i 29% amb esput) i *Streptococcus pneumoniae* (16% amb raspall protegit i 22% amb esput). No passa el mateix en la situació de MPOC estable en la que per esput s'obtenen un 44% de *Streptococcus pneumoniae* i un 27% d' *Haemophilus influenzae* i per raspall protegit un 48% d'*Haemophilus influenzae* i un 20% de *Streptococcus pneumoniae*, presentant una pràctica inversió de freqüència. El que existeixi més similitud en fase d'agudització que en fase estable s'explicaria per la facilitat per a produir expectoració de més qualitat. Aquestes dades es basen en els esputs que han pogut processar-se, però no representen la totalitat dels pacients analitzats. Cal que el pacient pugui expectorar i que l'expectoració sigui de la qualitat necessària per a ser cultivada. Per una altra banda, els esputs de qualitat no són mai estèrils, informant-se com a flora comensal. Amb el raspall protegit és possible determinar cultius estèrils, cultius amb flora no potencialment patògena i cultius amb gèrmens potencialment patògens, oferint d'aquesta forma una visió més ampla de la realitat.

Ja Irwin *et al*(50) en els seu estudi basat en l'aspirat transtraqueal, varen determinar que el tabaquisme actiu és un dels principals factors de risc. El nostre grup ho ha demostrat també basant-se en el raspall protegit i ho ha corroborat Zalacain *et al*(89). El grau d'obstrucció mesurat pel FEV1% no

resulta un factor de risc rellevant en l'estudi desenvolupat pel nostre grup. Per una altra banda, Zalacain *et al* (89), en una sèrie de pacients amb MPOC també estables i en la que s'inclou una representació més àmplia d'alteracions espiromètriques, afirma el contrari, quan es refereix a microorganismes potencialment patògens. Dades recents basades en l'esput de pacients aguditzats, com els treballs d'Eller *et al*(41) i Miravittles *et al* (36) ambdós publicats a Chest, demostren com el grau d'obstrucció determina, de forma estadísticament significativa, un tipus de bacteri. Amb un FEV1% > 50% predominaria el *Streptococcus pneumoniae* i els gèrmens no potencialment patògens, entre 35 i 50% *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*, mentre que per sota del 35%, existeix un predomini de bacils gram negatius. Encara que les publicacions de Eller *et al* i Miravittles *et al*, utilitzen l'esput en el context d'una agudització, si que afavoririen la hipòtesi de que el grau d'obstrucció estaria determinant la microbiologia de l'espai endobronquial.

L'etiologia de l'agudització de la MPOC segueix contenint més preguntes que respostes. La nostra sèrie, conjuntament amb les altres, permet observar com durant l'exacerbació augmenta el nombre de pacients amb cultiu positiu passant de 55% a 64% si no es contempla punt de tall, s'incrementa l'índex bacterià que passa de 4,2 a 5,5 i es dona una inversió de les poblacions bacterianes, passant els gèrmens potencialment patògens d'un 41% a 59%, mentre que els no potencialment patògens perden la seva predominàcia de la fase estable, tot reduint-se del 59% al 41%. Si descartem un tipus específic d'agudització causada per gèrmens no potencialment patògens, els episodis

susceptibles de ser tractats amb antibiòtics es reduïrien al 37,7% (0,59x64) dels pacients amb agudització tipus 1 o 2 d'Anthonissen, amb el millor dels casos (absència de punt de tall).

Si a la infecció bronquial ha resultat difícil assignar-li una parcel·la etiològica dins de l'agudització- tot i poder observar i intervenir en desenes d'elles- qualsevol aproximació etiopatogènica de la infecció en l'inici i/o progressió de la MPOC roman en l'extens camp de les especulacions. Malgrat que la hipòtesi del "cercle viciós" resulta plausible, hi mancaria un paper més rellevant dels tipus i concentracions bacterianes. Els gèrmens capaços d'induir el "cercle viciós" conformarien un veritable tipus d'infecció, mentre els gèrmens que no promoguessin el cercle viciós s'etiquetarien de colonitzadors.

7. CONCLUSIONS

- 7.1** El raspall protegit és una tècnica òptima per a la investigació de la població bacteriana endobronquial, ja que aconseguix estar exempt de contaminació de la flora orofaríngia i presenta una reproductibilitat qualitativa del 72,2%, comparable a l'obtinguda en la pneumònia.
- 7.2** El tabaquisme actiu és el factor de risc més important (OR 9,8) per a la colonització bacteriana en els pacients amb bronquitis crònica.
- 7.3** Els pacients amb MPOC en fase estable estan colonitzats en un 25% si es pren un punt de tall de 10^3 UFC/ml. Un 60% contenen *Haemophilus influenzae* i un 30% *Streptococcus pneumoniae*. En un 20% els cultius són polimicrobians. Sols un 20% estan presents en concentracions 10^4 UFC/ml.
- 7.4** Durant les exacerbacions ambulatories dels pacients amb MPOC existeix un augment de la prevalència fins un 51,7% així com també un increment de la seva concentració bacteriana, detectant-se concentracions 10^4 UFC/ml en un 46% dels cultius positius. Els gèrmens més freqüentment aïllats són: *Haemophilus influenzae* 66% i *Streptococcus pneumoniae* 20%. En 13% dels pacients els cultius són polimicrobians.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Monso E, Rosell A, Bonet G, Manterola J, Cardona PJ, Ruiz J, Morera J. Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis [see comments]. *Eur.Respir J* 1999;13(2):338-42.
2. Monso E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J, Ausina V. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 1995;152(4 Pt 1):1316-20.
3. Orriols R, Roig J, Ferrer J, Sampol G, Rosell A, Vallano A. Inhaled antibiotic therapy in non-cystic fibrosis patients with bronchiectasis and chronic bronchial infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir Med* 1999;93:476-80.
4. Monso E, Munoz-Rino F, Izquierdo J, Roca J, Masia N, Rosell A, Morera J. Occupational asthma in the community: risk factors in a western Mediterranean population. *Arch.Environ.Health* 1998;53(2):93-8.
5. Monso E, Rosell A. [The long-term follow-up of the smoker who has had minimal intervention for smoking (letter; comment)]. *Arch.Bronconeumol.* 1995;31(6):310

6. Monso E, Rosell A, Pujol E, Ruiz J, Fabregat A, Morera J. [Minimal intervention in smoking in the outpatient pneumonology consultation (see comments)]. *Arch.Bronconeumol.* 1994;30(1):12-5.
7. Monso E, Fiz JM, Izquierdo J, Alonso J, Coll R, Rosell A, Morera J. Quality of life in severe chronic obstructive pulmonary disease: correlation with lung and muscle function. *Respir Med* 1998;92(2):221-7.
8. Monso E, Rosell A, Bonet G, Manterola JM, Matas L, Ruiz J, Morera J. [The impact of bronchial colonization in the quality of life of patients with chronic, stable bronchitis]. *Med Clin.(Barc.)* 1998;111(15):561-4.
9. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, Yernault JC, Decramer M, Higenbottam T, Postma DS. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force [see comments]. *Eur.Respir J* 1995;8(8):1398-420.
10. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am Rev.Respir Dis.* 1987;136(1):225-44.
11. Jamal K, Cooney TP, Fleetham JA, Thurlbeck WM. Chronic bronchitis. Correlation of morphologic findings to sputum production and flow rates. *Am Rev.Respir Dis.* 1984;129(5):719-22.

-
12. Nagai A, West WW, Paul JL, Thurlbeck WM. The National Institutes of Health Intermittent Positive-Pressure Breathing trial: pathology studies. I. Interrelationship between morphologic lesions. *Am Rev. Respir Dis.* 1985;132(5):937-45.
 13. Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(5):1530-5.
 14. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. *European Respiratory Journal* 1995;8(8):1333-8.
 15. Connors AFJ, Dawson NV, Thomas C, Harrell FEJ, Desbiens N, Fulkerson WJ, Kussin P, Bellamy P, Goldman L, Knaus WA. Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. The SUPPORT investigators (Study to Understand Prognoses and Preferences for Outcomes and Risks of Treatments) [published erratum appears in *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Jan;155(1):386]. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(4 Pt 1):959-67.
 16. Riise GC, Ahlstedt S, Larsson S, Enander I, Jones I, Larsson P, Andersson B. Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax* 1995;50(4):360-5.
 17. Riise GC, Larsson S, Andersson BA. Bacterial adhesion to oropharyngeal and bronchial epithelial cells in smokers with chronic bronchitis and in healthy nonsmokers. *Eur. Respir J* 1994;7(10):1759-64.

18. Clancy R, Pang G, Dunkley M, Taylor D, Cripps A. Acute on chronic bronchitis: A model of mucosal immunology. [Review] [26 refs]. *Immunology & Cell Biology* 1995;73(5):414-7.
19. Brachman PS. Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett J.E., editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 1990 ed. Churchill Livingstone; 1990; 10, Principles and Methods. p. 147-55.
20. Domingue GJS, Woody HB. Bacterial persistence and expression of disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997;10(2):320-44.
21. Tramont E.C. Mandell G.L., Douglas R.G., Bennett J.E., editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone; 1990; 4, General or nonspecific host defense mechanisms. p. 33-41.
22. Woods D.E. Pennington J.E., editors. *Respiratory Infections: Diagnosis and Management*. 3^a ed. New York: Raven Press; 1994; 2, Bacterial Colonization of the Respiratory Tract: Clinical Significance. p. 35-41.
23. Asmundsson T, Kilburn K.H. Dulfano M.J., editors. *Sputum*. Barcelona: Editorial Jims; 1978; 4, Mecanismos de depuración del tracto respiratorio. p. 95-164.
24. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease [In Process Citation]. *Eur. Respir J* 1999;13(5):1177-88.
25. Clarke SW. Rationale of airway clearance. *Eur. Respir J Suppl.* 1989;7:599s-603s:599s-603s.

-
26. Kim WD. Lung mucus: a clinician's view. *Eur.Respir J* 1997;10(8):1914-7.
 27. Fraser R.G., Paré J.A., aré P.D., *et al.* Fraser R.G., Paré J.A., aré P.D., Fraser R.S., Genereux G.P., editors. *Diagnosis of Diseases of the Chest*. 2^a ed. W.B: Saunders Comany; 1988; 1, The Normal Chest. p. 1-290.
 28. Krzyzanowski M, Sherrill DL, Paoletti P, Lebowitz MD. Relationship of respiratory symptoms and pulmonary function to tar, nicotine, and carbon monoxide yield of cigarettes. *Am Rev.Respir Dis*. 1991;143(2):306-11.
 29. Fraser R.G., Paré J.A., Fraser R.S., *et al.* *Diagnosis of Diseases of the Chest*. W.B. Suanders Company; 1988; 11, Diseases of the Airways. p. 1970-2224.
 30. Bartlett JG, Finegold SM. Bacteriology of expectorated sputum with quantitative culture and wash technique compared to transtracheal aspirates. *Am Rev.Respir Dis*. 1978;117(6):1019-27.
 31. Bartlett JG. *Medical Microbiology: Quality Cost and Clinical Relevance*. New York: John Wiley and Sons; 1974;p. 27
 32. Heineman HS, Chawla JK, Lopton WM. Misinformation from sputum cultures without microscopic examination. *J Clin.Microbiol*. 1977;6(5):518-27.
 33. Baigelman W, Chodosh S, Pizzuto D, Sadow T. Quantitative sputum gram stains in chronic bronchial disease. *Lung* 1979;156(4):265-70.

34. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin.Proc.* 1975;50(6):339-44.
35. Chodosh S. Valid Information From Sputum (Editorial). *Chest* 1999;116(1):6-7.
36. Miravittles M, Espinosa C, Fernandez-Laso E., Martos J.A., Maldonado J.A., Gallego M. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. *Chest* 1999;116(1):40-6.
37. Peleman RA, Rytila PH, Kips JC, Joos GF, Pauwels RA. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease [In Process Citation]. *Eur.Respir J* 1999;13(4):839-43.
38. Smith JA, Redman P, Woodhead MA. Antibiotic use in patients admitted with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [In Process Citation]. *Eur.Respir J* 1999;13(4):835-8.
39. Viejo BJ, Fernandez JM, Laparra GJ. [An epidemiologic study of pathogenic agents found in acute exacerbations of chronic bronchitis in northern Spain (letter)]. *Arch.Bronconeumol.* 1998;34(2):106
40. Davies BI. Critical review of microbiological data and methods in diagnosis of lower respiratory tract infections. [Review] [9 refs]. *Monaldi Archives for Chest Disease* 1994;49(1):52-6.
41. Eller J, Ede A, Schaberg T, Niederman MS, Mauch H, Lode H. Infective exacerbations of chronic bronchitis: relation between bacteriologic etiology and lung function. *Chest* 1998;113(6):1542-8.

-
42. Stuart-Harris CH. The role of bacterial and viral infection in chronic bronchitis. *Arch. Environ. Health* 1968;16(4):586-95.
 43. Brown CJ. Chronic bronchitis and emphysema. *American Journal of Medicine* 1954;17:478-84.
 44. May JR. The bacteriology of chronic bronchitis. *Lancet* 1953;2:534-7.
 45. Miller DI, Joner R. The bacterial flora of the upper respiratory tract and sputum of working men. *J Pathol Bacteriol* 1964;87:182-5.
 46. Pecora D.V., Yegian D. Bacteriology of lower respiratory tract in health and chronic disease. *N. Engl. J Med* 1958;258:71-4.
 47. Tsujimoto M, Sawaki M, Mikasa K, Konishi M, Maeda K, Sakamoto M, Hamada K, Mori K, Teramoto S, Ueda K, *et al.* [A clinical study of chronic lower respiratory infection with *Haemophilus influenzae* by transtracheal aspiration]. *Kansenshogaku.Zasshi*. 1996;70(9):947-54.
 48. Kato T, Uemura H, Murakami N, Moriwaki H, Muto Y, Ueno K, Watanabe K. Incidence of anaerobic infections among patients with pulmonary diseases: Japanese experience with transtracheal aspiration and immediate bedside anaerobic inoculation. *Clin. Infect. Dis.* 1996;23 Suppl 1:S87-96:S87-S96
 49. Konishi M, Sawaki M, Mikasa K, Sakamoto M, Maeda K, Takeuchi S, Hamada K, Kunimatsu M, Narita N, Sano R. [Clinical study of acute bacterial bronchitis]. *Kansenshogaku.Zasshi*. 1993;67(5):452-8.

50. Irwin RS, Erickson AD, Pratter MR, Corrao WM, Garrity FL, Myers JR, Kaemmerlen JT. Prediction of tracheobronchial colonization in current cigarette smokers with chronic obstructive bronchitis. *J Infect.Dis.* 1982;145(2):234-41.
51. Bartlett JG. Diagnostic accuracy of transtracheal aspiration bacteriologic studies. *Am Rev.Respir Dis.* 1977;115(5):777-82.
52. Schmerber J, Deltenre M. A new fatal complication of transtracheal aspiration. *Scand.J Respir Dis.* 1978;59(4):232-5.
53. Schreiner A, Bjerkestrand G, Digranes A, Halvorsen FJ, Kommedal TM. Bacteriological findings in the transtracheal aspirate from patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Infection* 1978;6(2):54-6.
54. Hoeprich PD. Etiologic diagnosis of lower respiratory tract infections. *Calif.Med* 1970;112(2):1-8.
55. Hass H, Morris JF, Samson S, Kilbourn JP, Kim PJ. Bacterial flora of the respiratory tract in chronic bronchitis: comparison of transtracheal, fiberbronchoscopic, and oropharyngeal sampling methods. *Am Rev.Respir Dis.* 1977;116(1):41-7.
56. Bjerkestrand G, Digranes A, Schreiner A. Bacteriological findings in transtracheal aspirates from patients with chronic bronchitis and bronchiectasis: a preliminary report. *Scand.J Respir Dis.* 1975;56(4):201-7.

-
57. Reichek N, Lewin EB, Rhoden DL, Weaver RR, Crutcher JC. Antibody responses to bacterial antigens during exacerbations of chronic bronchitis. *Am Rev.Respir Dis.* 1970;101(2):238-44.
 58. Mogulkoc N, Karakurt S, Isalska B, Bayindir, elikel T, Korten V, olpan N. Acute Purulent Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Chlamydia pneumoniae Infection. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(1):349-53.
 59. Gardiner IT, Blenkharn I, Stradling P, Darrell JH. Anaerobic bacteriology of chronic bronchial disease. With a refined method of sampling bronchial secretions. *British Journal of Diseases of the Chest* 1977;71(4):277-84.
 60. Bartlett JG, Alexander J, Mayhew J, Sullivan-Sigler N, Gorbach SL. Should fiberoptic bronchoscopy aspirates be cultured? *Am Rev.Respir Dis.* 1976;114(1):73-8.
 61. Jordan GW, Wong GA, Hoeprich PD. Bacteriology of the lower respiratory tract as determined by fiber- optic bronchoscopy and transtracheal aspiration. *J Infect.Dis.* 1976;134(5):428-35.
 62. Spurzem JR, Thompson AB, Daughton DM, Mueller M, Linder J, Rennard SI. Chronic inflammation is associated with an increased proportion of goblet cells recovered by bronchial lavage. *Chest* 1991;100(2):389-93.
 63. Colt H.G. Bronchoalveolar lavage. "How I do it". *Journal of Bronchology* 1995;2:154-6.

64. Kirkpatrick MB, Bass JB, Jr. Quantitative bacterial cultures of bronchoalveolar lavage fluids and protected brush catheter specimens from normal subjects [see comments]. *American Review of Respiratory Disease* 1989;139(2):546-8.
65. Cabello H, Torres A, Celis R, El Ebiary M, Puig dlB, Xaubet A, González J, Agustí C, Soler N. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur.Respir J* 1997;10(5):1137-44.
66. Baselski VS, el-Torky M, Coalson JJ, Griffin JP. The standardization of criteria for processing and interpreting laboratory specimens in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1992;102(5 Suppl 1):571S-9S.
67. Meduri GU, Chastre J. The standardization of bronchoscopic techniques for ventilator- associated pneumonia. *Chest* 1992;102(5 Suppl 1):557S-64S.
68. Chastre J, Fagon JY, Soler P, Bornet M, Domart Y, Trouillet JL, Gibert C, Hance AJ. Diagnosis of nosocomial bacterial pneumonia in intubated patients undergoing ventilation: comparison of the usefulness of bronchoalveolar lavage and the protected specimen brush [published erratum appears in *Am J Med* 1989 Feb;86(2):258]. *Am J Med* 1988;85(4):499-506.
69. Kahn FW, Jones JM. Diagnosing bacterial respiratory infection by bronchoalveolar lavage. *J Infect.Dis.* 1987;155(5):862-9.

70. Meduri GU, Beals DH, Maijub AG, Baselski V. Protected bronchoalveolar lavage. A new bronchoscopic technique to retrieve uncontaminated distal airway secretions. *Am Rev.Respir Dis.* 1991;143(4 Pt 1):855-64.
71. Soler N, Torres A, Ewig S, Gonzalez J, Celis R, El-Ebiary M, Hernandez C, Rodriguez-Roisin R. Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(5 Pt 1):1498-505.
72. Pang JA, Cheng A, Chan HS, Poon D, French G. The bacteriology of bronchiectasis in Hong Kong investigated by protected catheter brush and bronchoalveolar lavage. *Am Rev.Respir Dis.* 1989;139(1):14-7.
73. Potter RT, Rotman F, Fernandez F, McNeill TM, Chamberlain JM. The bacteriology of the lower respiratory tract. Bronchoscopic study of 100 clinical cases. *Am Rev.Respir Dis.* 1968;97(6):1051-61.
74. Wanner A, Amikam B, Robinson MJ, Anandam EJ, Sackner MA. Comparison between the bacteriologic flora of different segments of the airways. Examination by bedside bronchofiberscopy. *Respiration* 1973;30(6):561-9.
75. Wimberley N, Faling LJ, Bartlett JG. A fiberoptic bronchoscopy technique to obtain uncontaminated lower airway secretions for bacterial culture. *Am Rev.Respir Dis.* 1979;119(3):337-43.

76. Hayes DA, McCarthy LC, Friedman M. Evaluation of two bronchofiberscopic methods of culturing the lower respiratory tract. *Am Rev.Respir Dis.* 1980;122(2):319-23.
77. Teague RB, Wallace RJJ, Awe RJ. The use of quantitative sterile brush culture and gram stain analysis in the diagnosis of lower respiratory tract infection. *Chest* 1981;79(2):157-61.
78. Winterbauer RH, Hutchinson JF, Reinhardt GN, Sumida SE, Dearden B, Thomas CA, Schneider PW, Pardee NE, Morgan EH, Little JW. The use of quantitative cultures and antibody coating of bacteria to diagnose bacterial pneumonia by fiberoptic bronchoscopy. *Am Rev.Respir Dis.* 1983;128(1):98-103.
79. Wimberley NW, Bass JBJ, Boyd BW, Kirkpatrick MB, Serio RA, Pollock, HM. Use of a bronchoscopic protected catheter brush for the diagnosis of pulmonary infections. *Chest* 1982;81(5):556-62.
80. Halperin SA, Suratt PM, Gwaltney JMJ, Groschel DH, Hendley JO, Eggleston PA. Bacterial cultures of the lower respiratory tract in normal volunteers with and without experimental rhinovirus infection using a plugged double catheter system. *Am Rev.Respir Dis.* 1982;125(6):678-80.
81. Castella J, Quintana MI, Ausina V, Puzo C, Roglan A, Artigas A, Cornudella R. [Diagnosis of bacterial pneumopathies in patients treated with mechanical ventilation. Comparison between tracheal aspiration and fibrobronchoscopy using a protected brush]. [Spanish]. *Medicina Clinica* 1983;81(8):327-9.

-
82. Pollock HM, Hawkins EL, Bonner JR, Sparkman T, Bass JBJ. Diagnosis of bacterial pulmonary infections with quantitative protected catheter cultures obtained during bronchoscopy. *J Clin. Microbiol.* 1983;17(2):255-9.
83. Dilworth JP, White RJ, Brown EM. Microbial flora of the trachea during intubation of patients undergoing upper abdominal surgery. *Thorax* 1992;47(10):818-20.
84. Vereen L, Smart LM, George RB. Antibody coating and quantitative cultures of bacteria in sputum and bronchial brush specimens from patients with stable chronic bronchitis. *Chest* 1986;90(4):534-6.
85. Riise GC, Larsson S, Larsson P, Jeansson S, Andersson BA. The intrabronchial microbial flora in chronic bronchitis patients: a target for N-acetylcysteine therapy? *European Respiratory Journal* 1994;7(1):94-101.
86. Martinez JA, Rodriguez E, Bastida T, Buges J, Torres M. Quantitative study of the bronchial bacterial flora in acute exacerbations of chronic bronchitis [letter]. *Chest* 1994;105(3):976
87. Zalacain R, Achotegui V, Pascal I, Camino J, Barron J, Sobradillo V. [Protected bacteriologic brushing in patients with severe copd]. *Arch. Bronconeumol.* 1997;33(1):16-9.
88. Pela R, Marchesani F, Agostinelli C, Staccioli D, Cekarini L, Bassotti C, Sanguinetti CM. Airways microbial flora in COPD patients in stable clinical conditions and during exacerbations: a bronchoscopic investigation. *Monaldi. Arch. Chest Dis.* 1998;53(3):262-7.

89. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barrón J, Achótegui V, Pijoan JI, Llorente JL. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease [see comments]. *Eur.Respir J* 1999;13(2):343-8.
90. Zalacain R. [Infection and chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch.Bronconeumol.* 1998;34(9):453-62.
91. Fagon JY, Chastre J, Trouillet JL, Domart Y, Dombret MC, Bornet M, Gibert C. Characterization of distal bronchial microflora during acute exacerbation of chronic bronchitis. Use of the protected specimen brush technique in 54 mechanically ventilated patients. *American Review of Respiratory Disease* 1990;142(5):1004-8.
92. Rosell A, Blavia R, Monso E, *et al.* Eficacia del cultivo de esputo en el estudio de la colonización bronquial en pacientes con bronquitis crónica en fase estable. [Abstract] *Archivos de Bronconeumología* 1996;32:(supl 2)35-.
93. Monroe PW, Muchmore HG, Felton FG, Pirtle JK. Quantitation of microorganisms in sputum. *Appl.Microbiol.* 1969;18(2):214-20.
94. Pirtle JK, Monroe PW, Smalley TK, Mohr JA, Rhoades ER. Diagnostic and therapeutic advantages of serial quantitative cultures of fresh sputum in acute bacterial pneumonia. *Am Rev.Respir Dis.* 1969;100(6):831-8.

-
95. Torres A, Martos A, Puig dlB, Ferrer M, El-Ebiary M, Gonzalez J, Gene A, Rodriguez-Roisin R. Specificity of endotracheal aspiration, protected specimen brush, and bronchoalveolar lavage in mechanically ventilated patients. *Am Rev.Respir Dis.* 1993;147(4):952-7.
 96. Chastre J, Viau F, Brun P, Pierre J, Dauge MC, Bouchama A, Akesbi A, Gibert C. Prospective evaluation of the protected specimen brush for the diagnosis of pulmonary infections in ventilated patients. *Am Rev.Respir Dis.* 1984;130(5):924-9.
 97. Baker AM, Bowton DL, Haponik EF. Decision making in nosocomial pneumonia. An analytic approach to the interpretation of quantitative bronchoscopic cultures. *Chest* 1995;107(1):85-95.
 98. Johanson WGJ, Seidenfeld JJ, Gomez P, de los S, Coalson JJ. Bacteriologic diagnosis of nosocomial pneumonia following prolonged mechanical ventilation. *Am Rev.Respir Dis.* 1988;137(2):259-64.
 99. Goodman RM, Yergin BM, Landa JF, Golivanux MH, Sackner MA. Relationship of smoking history and pulmonary function tests to tracheal mucous velocity in nonsmokers, young smokers, ex-smokers, and patients with chronic bronchitis. *Am Rev.Respir Dis.* 1978;117(2):205-14.
 100. Mossberg B, Camner P. Impaired mucociliary transport as a pathogenetic factor in obstructive pulmonary diseases. *Chest* 1980;77(2 Suppl):265-6.

101. Del Donno M, Pavia D, Agnew JE, Lopez-Vidriero MT, Clarke SW. Variability and reproducibility in the measurement of tracheobronchial clearance in healthy subjects and patients with different obstructive lung diseases. *Eur.Respir J* 1988;1(7):613-20.
102. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Takishima T, Yaegashi H, Takahashi T. Morphometric analysis of intraluminal mucus in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev.Respir Dis.* 1989;140(2):477-82.
103. Smaldone GC, Foster WM, O'Riordan TG, Messina MS, Perry RJ, Langenback EG. Regional impairment of mucociliary clearance in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 1993;103(5):1390-6.
104. Jansen HM, Sachs AP, van Alphen L. Predisposing conditions to bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease. [Review] [94 refs]. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 1995;151(6):2073-80.
105. Chodosh S, Medici TC. The bronchial epithelium in chronic bronchitis. I. Exfoliative cytology during stable, acute bacterial infection and recovery phases. *American Review of Respiratory Disease* 1971;104(6):888-98.
106. Riise GC, Larsson S, Andersson BA. A bronchoscopic brush biopsy study of large airway mucosal pathology in smokers with chronic bronchitis and in healthy nonsmokers. *Eur.Respir J* 1992;5(4):382-6.

-
107. Dulfano M.J., editors. Sputum. Ed. Jims; 1978; 7, Composición química de las secreciones traqueobronquiales humanas. p. 221-47.
 108. Joris L, Dab I, Quinton PM. Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways. *Am Rev. Respir Dis.* 1993;148(6 Pt 1):1633-7.
 109. Davies JR, Hovenberg HW, Linden CJ, Howard R, Richardson PS, Sheehan JK, Carlstedt I. Mucins in airway secretions from healthy and chronic bronchitic subjects. *Biochem.J* 1996;313(Pt 2):431-9.
 110. Wills PJ, Hall RL, Chan W, Cole PJ. Sodium chloride increases the ciliary transportability of cystic fibrosis and bronchiectasis sputum on the mucus-depleted bovine trachea. *J Clin. Invest.* 1997;99(1):9-13.
 111. Hudson TJ. Dornase in treatment of chronic bronchitis. *Ann. Pharmacother.* 1996;30(6):674-5.
 112. Sleight MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev. Respir Dis.* 1988;137(3):726-41.
 113. Lungarella G, Fonzi L, Ermini G. Abnormalities of bronchial cilia in patients with chronic bronchitis. An ultrastructural and quantitative analysis. *Lung* 1983;161(3):147-56.
 114. Verra F, Escudier E, Lebargy F, Bernaudin JF, De Cremoux H, Bignon J. Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 1995;151(3 Pt 1):630-4.

115. Swan GE, Hodgkin JE, Roby T, Mittman C, Jacobo N, Peters J. Reversibility of airways injury over a 12-month period following smoking cessation. *Chest* 1992;101(3):607-12.
116. Seybold ZV, Abraham WM, Gazeroglu H, Wanner A. Impairment of airway mucociliary transport by *Pseudomonas aeruginosa* products. Role of oxygen radicals. *Am Rev. Respir Dis.* 1992;146(5 Pt 1):1173-6.
117. Rayner CF, Rutman A, Dewar A, Cole PJ, Wilson R. Ciliary disorientation in patients with chronic upper respiratory tract inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(3 Pt 1):800-4.
118. Silva JR, Jones JA, Cole PJ, Poulter LW. The immunological component of the cellular inflammatory infiltrate in bronchiectasis. *Thorax* 1989;44(8):668-73.
119. van de Plassche-Boers EM, Drexhage HA, Kokje-Kleingeld M, Leezenberg HA. Parameters of T cell mediated immunity to commensal microorganisms in patients with chronic purulent rhinosinusitis: a comparison between delayed type hypersensitivity skin test, lymphocyte transformation test and macrophage migration inhibition factor assay. *Clin. Exp. Immunol.* 1986;66(3):516-24.
120. Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 1984;64(5):959-66.
121. Widdicombe J. Relationships among the composition of mucus, epithelial lining liquid, and adhesion of microorganisms. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(6):2088-92.

-
122. Vogel L, Schoonbrood D, Geluk F, Hoek F, Bresser P, Out T, Jansen H, Dankert J, van Alphen L. Iron-binding proteins in sputum of chronic bronchitis patients with *Haemophilus influenzae* infections. *European Respiratory Journal* 1997;10(10):2327-33.
123. Murphy TF, Sethi S. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. [Review] [197 refs]. *American Review of Respiratory Disease* 1992;146(4):1067-83.
124. Groeneveld K, Eijk PP, van Alphen L, Jansen HM, Zanen HC. *Haemophilus influenzae* infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease despite specific antibodies in serum and sputum. *Am Rev.Respir Dis.* 1990;141(5 Pt 1):1316-21.
125. Qvarfordt I, Riise GC, Larsson S, Almqvist G, Rolof J, Bengtsson T, Andersson BA. Immunological findings in blood and bronchoalveolar lavage fluid in chronic bronchitis patients with recurrent infectious exacerbations. *Eur.Respir J* 1998;11(1):46-54.
126. Adler KB, Hendley DD, Davis GS. Bacteria associated with obstructive pulmonary disease elaborate extracellular products that stimulate mucin secretion by explants of guinea pig airways. *Am J Pathol.* 1986;125(3):501-14.
127. Rayner CF, Jackson AD, Rutman A, Dewar A, Mitchell TJ, Andrew PW, Cole PJ, Wilson R. Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect.Immun.* 1995;63(2):442-7.

128. Read RC, Wilson R, Rutman A, Lund V, Todd HC, Brain AP, Jeffery PK, Cole PJ. Interaction of nontypable *Haemophilus influenzae* with human respiratory mucosa in vitro. *J Infect.Dis.* 1991;163(3):549-58.
129. Tsang KW, Rutman A, Tanaka E, Lund V, Dewar A, Cole PJ, Wilson R. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with human respiratory mucosa in vitro [see comments]. *Eur.Respir J* 1994;7(10):1746-53.
130. Stephens DS, Farley MM. Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Rev.Infect.Dis.* 1991;13(1):22-33.
131. Clarke CW, Hannant CA, Scicchitano R, Donald KJ, Jackson B. Antigen of *Haemophilus influenzae* in bronchial tissue. *Thorax* 1981;36(9):665-8.
132. van Alphen L, Jansen HM, Dankert J. Virulence factors in the colonization and persistence of bacteria in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(6):2094-9.
133. Taylor DC, Clancy RL, Cripps AW, Butt H, Bartlett L, Murree-Allen K. An alteration in the host-parasite relationship in subjects with chronic bronchitis prone to recurrent episodes of acute bronchitis. *Immunol.Cell Biol.* 1994;72(2):143-51.
134. Faden H, Duffy L, Foels T, Hong JJ. Adherence of nontypeable *Haemophilus influenzae* to respiratory epithelium of otitis-prone and normal children. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.* 1996;105(5):367-70.

135. Lomholt H, van Alphen L, Kilian M. Antigenic variation of immunoglobulin A1 proteases among sequential isolates of *Haemophilus influenzae* from healthy children and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Infect.Immun.* 1993;61(11):4575-81.
136. Lee CJ, Banks SD, Li JP. Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Rev.Microbiol.* 1991;18(2):89-114.
137. Murphy TF. Studies of the outer membrane proteins of *Branhamella catarrhalis*. *Am J Med* 1990;88(5A):41S-5S.
138. Murphy TF, Apicella MA. Nontypable *Haemophilus influenzae*: a review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection. *Rev.Infect.Dis.* 1987;9(1):1-15.
139. Karasic RB, Trumpp CE, Gnehm HE, Rice PA, Pelton SI. Modification of otitis media in chinchillas rechallenged with nontypable *Haemophilus influenzae* and serological response to outer membrane antigens. *J Infect.Dis.* 1985;151(2):273-9.
140. Groeneveld K, van Alphen L, Voorter C, Eijk PP, Jansen HM, Zanen HC. Antigenic drift of *Haemophilus influenzae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Infect.Immun.* 1989;57(10):3038-44.
141. Barreiro B, Esteban L, Prats E, Verdaguer E, Dorca J, Manresa F. *Branhamella catarrhalis* respiratory infections. *European Respiratory Journal* 1992;5(6):675-9.

142. Shemer-Avni Y, Lieberman D. Chlamydia pneumoniae-induced ciliostasis in ciliated bronchial epithelial cells. *J Infect.Dis.* 1995;171(5):1274-8.
143. Blasi F, Legnani D, Lombardo VM, Negretto GG, Magliano E, Pozzoli R, Chiodo F, Fasoli A, Allegra L. Chlamydia pneumoniae infection in acute exacerbations of COPD. *European Respiratory Journal* 1993;6(1):19-22.
144. Miyashita N, Niki Y, Nakajima M, Kawane H, Matsushima T. Chlamydia pneumoniae infection in patients with diffuse panbronchiolitis and COPD. *Chest* 1998;114(4):969-71.
145. Beaty CD, Grayston JT, Wang SP, Kuo CC, Reto CS, Martin TR. Chlamydia pneumoniae, strain TWAR, infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Review of Respiratory Disease* 1991;144(6):1408-10.
146. Tuazon CU, Murray HW. Pennington J.E., editors. *Respiratory infection: Diagnosis and Management*. New York: Raven Press; 1994; 20, Atypical pneumonias. p. 407-33.
147. Philit F, Etienne J, Calvet A, Mornex JF, Trillet V, Aymard M, Brune J, Cordier JF. [Infectious agents associated with exacerbations of chronic obstructive bronchopneumopathies and asthma attacks]. *Rev.Mal.Respir* 1992;9(2):191-6.
148. Buscho RO, Saxtan D, Shultz PS, Finch E, Mufson MA. Infections with viruses and Mycoplasma pneumoniae during exacerbations of chronic bronchitis. *Journal of Infectious Diseases* 1978;137(4):377-83.

-
149. Rose RM, Pinkston P, O'Donnell C, Jensen WA. Viral infection of the lower respiratory tract. *Clin.Chest Med* 1987;8(3):405-18.
 150. Warshauer D, Goldstein E, Akers T, Lippert W, Kim M. Effect of influenza viral infection on the ingestion and killing of bacteria by alveolar macrophages. *Am Rev.Respir Dis.* 1977;115(2):269-77.
 151. Monto AS, Higgins MW, Ross HW. The Tecumseh study of respiratory illness. VIII. Acute infection in chronic respiratory disease and comparison groups. *Am Rev.Respir Dis.* 1975;111(1):27-36.
 152. Monto AS, Bryan ER. Susceptibility to rhinovirus infection in chronic bronchitis. *American Review of Respiratory Disease* 1978;118(6):1101-3.
 153. Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. [Review] [53 refs]. *Clinical Infectious Diseases* 1997;25(6):1421-9.
 154. Smith CB, Golden CA, Kanner RE, Renzetti ADJ. Association of viral and *Mycoplasma pneumoniae* infections with acute respiratory illness in patients with chronic obstructive pulmonary diseases. *Am Rev.Respir Dis.* 1980;121(2):225-32.
 155. Gump DW, Phillips CA, Forsyth BR, McIntosh K, Lamborn KR, Stouch WH. Role of infection in chronic bronchitis. *American Review of Respiratory Disease* 1976;113(4):465-74.
 156. Tager I. Fitzgerald JM, editors. *Pulmonary Diseases and Disorders*. 2^a edició ed. McGrawHill; 1988; 96, Chronic bronchitis. p. 1543-51.

157. Sachs AP, van der Waaij D, Groenier KH, Koeter GH, Schiphuis J. Oropharyngeal flora in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. Indigenous oropharyngeal microorganisms in outpatients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev.Respir Dis.* 1993;148(5):1302-7.
158. Smith CB, Golden C, Klauber MR, Kanner R, Renzetti A. Interactions between viruses and bacteria in patients with chronic bronchitis. *Journal of Infectious Diseases* 1976;134(6):552-61.
159. Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann.Intern.Med* 1987;106(2):196-204.
160. Jorgensen AF, Coolidge J, Pedersen PA, Petersen KP, Waldorff S, Widding E. Amoxicillin in treatment of acute uncomplicated exacerbations of chronic bronchitis. A double-blind, placebo-controlled multicentre study in general practice. *Scand.J Prim.Health Care* 1992;10(1):7-11.
161. Hoepelman IM, Mollers MJ, van Schie MH, Greefhorst AP, Schlosser NJ, Sinninghe DE, van de Moosdijk CN, Dalinghaus WH, Eland ME, Mol SJ, *et al.* A short (3-day) course of azithromycin tablets versus a 10-day course of amoxicillin-clavulanic acid (co-amoxiclav) in the treatment of adults with lower respiratory tract infections and effects on long-term outcome. *Int.J Antimicrob.Agents* 1997;9(3):141-6.

-
162. Sachs AP, Koeter GH, Groenier KH, van der Waaij D, Schiphuis J, Meyboom-de JB. Changes in symptoms, peak expiratory flow, and sputum flora during treatment with antibiotics of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease in general practice. *Thorax* 1995;50(7):758-63.
163. Saint S, Bent S, Vittinghoff E, Grady D. Antibiotics in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. A meta-analysis [see comments]. *JAMA* 1995;273(12):957-60.
164. Ball P, Make B. Acute exacerbations of chronic bronchitis: an international comparison. *Chest* 1998;113(3 Suppl):199S-204S.
165. Barker DJ, Osmond C. Childhood respiratory infection and adult chronic bronchitis in England and Wales. *British Medical Journal Clinical Research Ed* 1986;. 293(6557):1271-5.
166. Shaheen SO, Barker DJ, Holgate ST. Do lower respiratory tract infections in early childhood cause chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5):1649-51.
167. Gold DR, Tager IB, Weiss ST, Tosteson TD, Speizer FE. Acute lower respiratory illness in childhood as a predictor of lung function and chronic respiratory symptoms. *Am Rev.Respir Dis.* 1989;140(4):877-84.
168. Matsuse T, Hayashi S, Kuwano K, Keunecke H, Jefferies WA, Hogg JC. Latent adenoviral infection in the pathogenesis of chronic airways obstruction. *American Review of Respiratory Disease* 1992;146(1):177-84.

169. Bates DV. The fate of the chronic bronchitic: a report of the ten-year follow-up in the Canadian Department of Veteran's Affairs coordinated study of chronic bronchitis. The J. Burns Amberson Lecture of the American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis.* 1973;108(5):1043-65.
170. Kanner RE, Renzetti ADJ, Klauber MR, Smith CB, Golden CA. Variables associated with changes in spirometry in patients with obstructive lung diseases. *Am J Med* 1979;67(1):44-50.
171. Gompertz S, O'Brien C, Bayley D, *et al.* Changes in bronchial inflammation during mucopurulent and purulent exacerbations of chronic bronchitis. [Abstract] *Eur.Respir J* 1999;14:(supl 30)165 s
172. AGN Agustí, Noguera A, Villaverde JM, *et al.* Serial measurements of exhaled nitric oxide during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. [Abstract] *Eur Respir Rev* 1999;14:(suppl 30)252s
173. Currie DC, Peters AM, Garbett ND, George P, Strickland B, Lavender JP, Cole PJ. Indium-111 labelled granulocyte scanning to detect inflammation in the lungs of patients with chronic sputum expectoration. *Thorax* 1990;45(7):541-4.
174. Thompson AB, Huerta G, Robbins RA, Sisson JH, Spurzem JR, von Essen S, Rickard KA, Romberger DJ, Rubinstein I, Ghafouri M. The bronchitis index. A semiquantitative visual scale for the assessment of airways inflammation. *Chest* 1993;103(5):1482-8.

-
175. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(2):449-53.
176. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(2):530-4.
177. Thompson AB, Daughton D, Robbins RA, Ghafouri MA, Oehlerking M, Rennard SI. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am Rev. Respir Dis.* 1989;140(6):1527-37.
178. Linden M, Rasmussen JB, Piitulainen E, Tunek A, Larson M, Tegner H, Venge P, Laitinen LA, Brattsand R. Airway inflammation in smokers with nonobstructive and obstructive chronic bronchitis. *Am Rev. Respir Dis.* 1993;148(5):1226-32.
179. Balbi B, Bason C, Balleari E, Fiasella F, Pesci A, Ghio R, Fabiano F. Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis. *Eur. Respir J* 1997;10(4):846-50.
180. Corradi M, Majori M, Cacciani GC, Consigli GF, de'Munari E, Pesci A. Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54(7):572-5.

181. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(3 Pt 1):813-6.
182. Brown DM, Drost E, Donaldson K, MacNee W. Deformability and CD11/CD18 expression of sequestered neutrophils in normal and inflamed lungs. *Am J Respir Cell Mol.Biol.* 1995;13(5):531-9.
183. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(4 Pt 1):1055-60.
184. Riise GC, Larsson S, Lofdahl CG, Andersson BA. Circulating cell adhesion molecules in bronchial lavage and serum in COPD patients with chronic bronchitis. *Eur.Respir J* 1994;7(9):1673-7.
185. Saetta M. Central airways inflammation in the development of COPD. *European Respiratory Journal* 1997;7(43):109-10.
186. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(3 Pt 1):822-6.
187. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(3):852-7.

188. Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(5):1633-9.
189. Frew AJ. Chronic mucosal inflammation. *Eur Respir Rev* 1998;8(62):994-8.
190. Chanez P, Vignola AM, Bousquet J. Remodelling of the airway in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Rev* 1997;7(43):142-5.
191. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, la Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G, Bousquet J. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(2 Pt 1):591-9.
192. Romberger DJ, Beckmann JD, Claassen L, Ertl RF, Rennard SI. Modulation of fibronectin production of bovine bronchial epithelial cells by transforming growth factor-beta. *Am J Respir Cell Mol.Biol.* 1992;7(2):149-55.
193. Okhuni Y, Buchalter SE, Mio T. TGF-beta increases staphylococcal adherence to human bronchial epithelial cells. [Abstract] *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:A14
194. Plotkowski MC, Zahm JM, Tournier JM, Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to normal and injured respiratory mucosa. *Mem.Inst.Oswaldo.Cruz.* 1992;87 Suppl 5:61-8:61-8.

195. Adesina AM, Vallyathan V, McQuillen EN, Weaver SO, Craighead JE. Bronchiolar inflammation and fibrosis associated with smoking. A morphologic cross-sectional population analysis. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(1):144-9.
196. Cosio M, Ghezzo H, Hogg JC, Corbin R, Loveland M, Dosman J, Macklem PT. The relations between structural changes in small airways and pulmonary- function tests. *N.Engl.J Med* 1978;298(23):1277-81.
197. Gelb AF, Schein M, Kuei J, Tashkin DP, Muller NL, Hogg JC, Epstein JD, Zamel N. Limited contribution of emphysema in advanced chronic obstructive pulmonary disease [see comments]. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(5):1157-61.
198. Toews GB, Gross GN, Pierce AK. The relationship of inoculum size to lung bacterial clearance and phagocytic cell response in mice. *Am Rev Respir Dis.* 1979;120(3):559-66.
199. Rodriguez JR, Seals JE, Radin A, Lin JS, Mandl I, Turino GM. Neutrophil lysosomal elastase activity in normal subjects and in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1979;119(3):409-17.
200. Cole P. Host-microbe relationships in chronic respiratory infection. *Respiration* 1989;55 Suppl 1:5-8:5-8.
201. Lapa, Guerreiro D, Noble B, Poulter LW, Cole PJ. Immunopathology of experimental bronchiectasis. *Am J Respir Cell Mol.Biol.* 1989;1(4):297-304.

-
202. Khair OA, Davies RJ, Devalia JL. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. [Review] [91 refs]. *European Respiratory Journal* 1996;9(9):1913-22.
203. Manolitsas ND, Trigg CJ, McAulay AE, Wang JH, Jordan SE, D'Ardenne AJ, Davies RJ. The expression of intercellular adhesion molecule-1 and the beta 1-integrins in asthma [published erratum appears in *Eur Respir J* 1994 Oct;7(10):1910]. *Eur Respir J* 1994;7(8):1439-44.
204. Devalia JL, Campbell AM, Sapsford RJ, Rusznak C, Quint D, Godard P, Bousquet J, Davies RJ. Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol.Biol.* 1993;9(3):271-8.
205. Menezes AM, Victora CG, Rigatto M. Chronic bronchitis and the type of cigarette smoked. *Int.J Epidemiol.* 1995;24(1):95-9.
206. Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, Fitzgerald T, Dubin W. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* 1999;115(3):829-35.
207. Swan GE, Schumann GB, Roby TJ, Sorensen KW. Quantitative analysis of sputum cytologic differences between smokers and nonsmokers. *Diagn.Cytopathol.* 1991;7(6):569-75.
208. Marcy TW, Merrill WW. Cigarette smoking and respiratory tract infection. [Review] [86 refs]. *Clinics in Chest Medicine* 1987;8(3):381-91.

209. Raman AS, Swinburne AJ, Fedullo AJ. Pneumococcal adherence to the buccal epithelial cells of cigarette smokers. *Chest* 1983;83(1):23-7.