




Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorado en Medicina

Departament de Medicina. Facultat de Medicina

**AGUDIZACIONES DE CAUSA INFECCIOSA EN LA
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA GRAVE**

Tesis realizada y presentada por

Miguel Gallego Díaz

Director: Conchita Montón Soler

Tutor: Jordi Vallés Daunis

Sabadell 2016

Facultat de Medicina

Conchita Montón Soler, Doctora en Medicina por la Universidad de Barcelona (UB).

Certifica:

Que la Tesis Doctoral titulada “**AGUDIZACIONES DE CAUSA INFECCIOSA EN LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA GRAVE**”, presentada por Miguel Gallego Díaz e inscrita en el departamento de Medicina de la UAB y dirigida por mí para optar al grado de doctor, representa una gran aportación al tema y reúne méritos suficientes para ser presentada y defendida delante del tribunal correspondiente.

Y, para que así conste a los efectos oportunos firmo este certificado.

Dr^a. Conchita Montón Soler

Facultat de Medicina

Jordi Vallés Daunis, Doctor en Medicina, Professor titular del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona(UAB), Unitat Docent Hospital de Sabadell.

Certifica:

En calidad de tutor, que la Tesis Doctoral titulada “**AGUDIZACIONES DE CAUSA INFECCIOSA EN LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTICA CRÓNICA GRAVE**”, presentada por Miguel Gallego Díaz e inscrita en el departamento de Medicina de la UAB para optar al grado de doctor, representa una gran aportación al tema y reúne méritos suficientes para ser presentada y defendida delante del tribunal correspondiente.

Y, para que así conste a efectos oportunos, firmo este certificado:

Dr. Jordi Vallés Daunis

“Todos deben dejar algo detrás cuando mueran, decía mi padre. Un niño o un libro, o una pintura, o una casa, o una pared construida, o un par de zapatos hechos. O un jardín plantado. Algo que tu mano tocó de alguna manera para que tu alma tenga algún lugar a donde ir cuando mueras, y cuando la gente mire a ese árbol o planta que plantaste, estarás ahí”

Ray Bradbury

A la memoria de mi madre y de la Dr^a Mariscal, eminente microbióloga

Publicaciones derivadas de la tesis (Anexo)

1.- Gallego M, Pomares X, Espasa M, Castañer E, Solé M, Suárez D, Monsó E, Montón C. *Pseudomonas aeruginosa* isolates in severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization and risk factors. *BMC Pulm Med.* 2014 Jun 26; 14:103

2.- Miguel Gallego, Xavier Pomares, Silvia Capilla, M Angeles Marcos, David Suárez, Eduard Monsó, Concepción Montón. C-reactive protein in outpatients with acute exacerbation of COPD: its relationship with microbial etiology and severity. *International Journal of COPD* (aceptada pendiente de publicación)

FINANCIACIÓN:

FUNDACIÓ MARATÓ TV3

SOCAP

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.1. Generalidades..... | 13 |
| 1.2. Exacerbaciones en la EPOC..... | 15 |
| 1.2.1. Definición..... | 15 |
| 1.2.2. Características..... | 16 |
| 1.3. Etiología de las exacerbaciones..... | 17 |
| 1.3.1. Colonización bacteriana..... | 19 |
| 1.3.2. Exacerbación por bacterias | 20 |
| 1.3.3. Colonización vírica..... | 21 |
| 1.3.4. Exacerbación por virus | 22 |
| 1.4. Respuesta inflamatoria y microorganismo..... | 23 |
| 1.5. Gravedad de la exacerbación..... | 24 |
| 1.5.1. Biomarcadores de gravedad | 25 |
| 1.6. Cobertura antibiótica de la exacerbación..... | 27 |
| 1.6.1. Factores de riesgo de <i>P. aeruginosa</i> | 28 |
| 1.6.2. Biomarcadores y tratamiento antibiótico | 29 |
| 2. JUSTIFICACIÓN GENÉRICA DE LA INVESTIGACIÓN | 31 |
| 3. HIPÓTESIS | 32 |
| 4. OBJETIVOS..... | 33 |
| 4.1. Estudio 1: Etiología y respuesta inflamatoria en las exacerbaciones de los enfermos con EPOC grave | 33 |
| 4.2. Estudio 2: Factores de riesgo de infección por <i>P. aeruginosa</i> | 33 |

5. MATERIAL Y MÉTODOS.....34

| | |
|--|----|
| 5.1. Diseño del estudio..... | 34 |
| 5.2. Criterios de inclusión..... | 34 |
| 5.3. Criterios de exclusión..... | 34 |
| 5.4. Microbiología..... | 35 |
| 5.4.1. Cultivo bacteriológico..... | 35 |
| 5.4.2. RT-PCR para detección de virus..... | 36 |
| 5.4.3. Genotipado de <i>P. aeruginosa</i> | 36 |
| 5.4.4. Definiciones..... | 37 |
| 5.4.4.1. Colonización crónica por <i>P. aeruginosa</i> | 37 |
| 5.4.4.2. Multirresistencia..... | 37 |
| 5.5. Evaluación radiológica de las bronquiectasias..... | 38 |
| 5.6. Variables del estudio..... | 39 |
| 5.7. Análisis estadístico..... | 39 |

6. RESULTADOS41

| | |
|---|----|
| 6.1. Resultados del Estudio 1..... | 43 |
| 6.1.1. Niveles de proteína C reactiva y etiología de las exacerbaciones..... | 45 |
| 6.1.2. Niveles de proteína C reactiva y gravedad de la exacerbación..... | 47 |
| 6.2. Resultados del Estudio 2..... | 49 |
| 6.2.1. Prevalencia y factores de riesgo para la presencia de <i>P.aeruginosa</i> | 49 |
| 6.2.2. Colonización crónica por <i>P.aeruginosa</i> | 52 |
| 6.2.3. Caracterización microbiológica de las cepas de <i>P.aeruginosa</i> | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 7. DISCUSIÓN | 59 |
| 7.1. Estudio 1: Etiología y respuesta inflamatoria en las exacerbaciones de los enfermos con EPOC grave | 59 |
| 7.1.1. Limitaciones del Estudio 1 | 61 |
| 7.2. Estudio 2: Factores de riesgo de infección por <i>P.aeruginosa</i> en la EPOC grave..... | 62 |
| 7.2.1. Limitaciones del Estudio 2 | 65 |
| | |
| 8. CONCLUSIONES | 66 |
| 8.1. Conclusiones del Estudio 1 | 66 |
| 8.2. Conclusiones del Estudio 2 | 66 |
| | |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 67 |
| | |
| 10. ANEXOS | 79 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AEPOC | Agudización enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| ADN | Acido dexosirribonucleico |
| ARN | Acido ribonucleico |
| BAL | Lavado broncoalveolar |
| COTE | COPD Specific Comorbidity Test |
| EPOC | Enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| FR | Frecuencia respiratoria |
| FEV1 | Volumen espiratorio forzado en el primer segundo |
| FVC | Capacidad vital forzada |
| GEE | General equation estimation |
| GOLD | Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease |
| HR | Hazard ratio |
| IMC | Índice de masa corporal |
| IC 95% | Intervalo de confianza del 95% |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL.8 | Interleucina 8 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| Kpa | Kilopascal |
| L | Litro |
| MDR | Multirresistente |
| Mg | miligramos |
| mmHg | Milímetros de mercurio |
| MPP | Microorganismo potencialmente patógeno |
| OR | Odds ratio |
| PA | <i>Pseudomona aeruginosa</i> |
| PaCO2 | Presión parcial arterial de dióxido de carbono |
| PaO2 | Presión parcial arterial de oxígeno |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PFGE | Electroforesis en gel de campo pulsado |
| RIC | Rango intercuartil |

| | |
|----------|---|
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa |
| SaTO2 | Saturación de oxígeno |
| TACAR | Tomografía axial computarizada de alta resolución |
| VRS | Virus respiratorio sincitial |
| TNF-alfa | Factor de necrosis tumoral |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |

1.INTRODUCCIÓN

1.1.Generalidades

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad respiratoria que cursa con obstrucción poco reversible de la vía aérea y es producida mayoritariamente por el humo del tabaco y en algunas zonas por el de leña. La enfermedad también presenta una serie de cambios patológicos en el pulmón y se asocia a manifestaciones extrapulmonares e importantes comorbilidades que contribuyen a la gravedad de la persona enferma (1).

Desde el punto de vista funcional se define como un índice FEV_1/FVC del $< 0,7$ en la maniobra posbroncodilatadora. La gravedad de la obstrucción se mide por la caída del FEV_1 , pudiendo ser: leve: $\geq 80\%$; moderada: $50\% \leq FEV_1 < 80\%$; grave: $30\% \leq FEV_1 < 50\%$; muy grave: $FEV_1 < 30\%$.(1)

En nuestro país, estudios de base poblacional como EPI-SCAN han establecido una prevalencia de la EPOC en la población española de 40-80 años del 10,2% (15,1% en varones y 5,7% mujeres) (2). A nivel mundial y de acuerdo con la más reciente publicación de la OMS existen 328 millones de personas afectadas por esta enfermedad y se considera actualmente la 3ª causa de mortalidad únicamente por detrás de la cardiopatía isquémica y el accidente cerebro-vascular (3). En nuestro país, en el año 2013, las enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores representaron la cuarta causa de muerte (responsables del 3,9% del total de defunciones), después del cáncer (27,4%), las enfermedades del corazón (20,3%) y las enfermedades cerebrovasculares (7,1%). La tasa de mortalidad bruta por EPOC, en el año 2013 fue de 33 por 100.000 habitantes para ambos sexos (49,6 en hombres y 16,9 en mujeres), suponiendo un descenso del 30,5% respecto al año 2001 (4). Asimismo supusieron según datos del 2014 el tercer motivo de ingreso hospitalario y el tercero en número de estancias (5).

La principal causa de muerte es la evolución de la propia enfermedad. Entre el 50–80% de los pacientes con EPOC, en nuestro entorno, mueren por causa respiratoria ya sea por agudización (30–50%) de la propia EPOC, por neoplasia de pulmón (8,5–27%) o por otras causas de origen respiratorio (6). En fases más iniciales de la enfermedad, las causas de muerte son en mayor proporción de origen no respiratorio, aunque la mayoría relacionadas con el consumo de

tabaco, sobretodo neoplasias y enfermedades vasculares (cardiopatía isquémica y accidente cerebral vascular).

La EPOC cursa de forma insidiosa y progresiva causando disnea de esfuerzo, tos y expectoración crónica que puede conducir en los casos más extremos a la insuficiencia respiratoria crónica y al fallecimiento del enfermo. En general se acepta que entre un 25-30% de las personas expuestas al humo de tabaco desarrollarán obstrucción bronquial irreversible (7).

Desde hace unos años la gravedad de la EPOC no se mide únicamente con el índice FEV₁ sino que se han incorporado escalas multidimensionales como el BODE o derivados con el objetivo de clasificar al paciente de forma más adecuada (8). La escala BODE adoptada principalmente por la guía GesEPOC (9) tiene en cuenta el índice de masa corporal, la escala de disnea, la gravedad de la obstrucción bronquial y la distancia recorrida en la prueba de la marcha de 6 minutos (8). Un incremento en un punto del índice BODE se asocia a un aumento del 34% en la mortalidad por todas las causas y del 62% en la mortalidad de causa respiratoria (8). Asimismo al ser una enfermedad inflamatoria tiene por característica el asociarse con otras comorbilidades que pueden empeorar el pronóstico. Así está demostrada una mayor prevalencia de hipertensión arterial, diabetes *mellitus*, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca (que puede llegar a estar presente en el 32% de los pacientes con EPOC más grave), cáncer, enfermedad vascular periférica o infecciones respiratorias. Otras comorbilidades asociadas serían arritmias, hipertensión pulmonar, síndrome de apneas del sueño, osteoporosis, miopatía, caquexia, glaucoma o cataratas, anemia, enfermedad tromboembólica o deterioro cognitivo. En muchas de estas entidades existe una relación con el tabaco, pero en otras es el estado inflamatorio el que se relaciona con tales comorbilidades (10,11). Estas comorbilidades pueden tener un impacto negativo en la evolución de la EPOC, tanto por el incremento del riesgo de muerte como el empeoramiento de la calidad de vida mediada por cuestionarios de salud. El riesgo asociado de mortalidad se ha establecido mediante el índice COTE (*COPD Specific Comorbidity Test*) que incluye 12 comorbilidades (sobre 79 registradas) que afectan de forma significativa a la mortalidad en estos enfermos: cáncer de pulmón, de esófago, de mama y pancreático, cirrosis hepática, fibrilación o *flutter* auricular, arteriopatía

coronaria, diabetes con neuropatía, fibrosis pulmonar, fallo cardíaco congestivo, *ulcus* gastroduodenal y ansiedad (10).

Una puntuación en el índice COTE superior o igual a cuatro puntos incrementó en 2,2 veces el riesgo de muerte (HR, 2,26 a 2,68, $p < 0,001$) en todos los cuartiles del índice BODE (10).

1.2. Exacerbaciones en la EPOC

1.2.1. Definición

La agudización o exacerbación se define como un episodio agudo de inestabilidad clínica que acontece en el curso natural de la enfermedad y se caracteriza por un empeoramiento mantenido de los síntomas respiratorios que va más allá de sus variaciones diarias. Los principales síntomas referidos son empeoramiento de la disnea, tos, incremento del volumen y/o cambios en el color del esputo (9).

En 1987, Anthonisen *et al.* (12) investigaron si la antibioterapia podría ser beneficiosa en el manejo de las agudizaciones de la EPOC. Definieron específicamente el aumento de la disnea, la purulencia del esputo y el volumen del esputo como indicativos de infección, así se consideró la exacerbación tipo I si presentaba los tres síntomas, tipo II si presentaba dos o de tipo III si presentaba uno de los tres síntomas. Se observó beneficio del tratamiento antibiótico cuando las agudizaciones eran del tipo I o del tipo II. En esta definición no se tenía en cuenta el tiempo de evolución de la agudización, únicamente los síntomas.

Años después, Rodríguez-Roisín (13), en un intento de homogeneizar una definición que pudiera ser útil para la realización de ensayos clínicos, propuso la agudización como un empeoramiento mantenido de la situación de un paciente con EPOC, desde su estado basal, por encima de las fluctuaciones diarias, que es agudo en su inicio y que requiere modificar su tratamiento habitual. En esta definición también se definía la gravedad: leve, cuando el paciente no solicitaba ayuda médica, moderada cuando acudía a su médico y

grave cuando precisaba hospitalización. Con algunas variaciones esta definición es la que han adoptado las principales guías clínicas de EPOC.

De acuerdo con estas definiciones y sus variantes, otras patologías como el neumotórax o el tromboembolismo pulmonar pueden suponer un empeoramiento agudo de los síntomas que requiera un cambio en la medicación. Asimismo un cuadro neumónico puede producir síntomas superponibles a los criterios de Anthonisen y que únicamente con la obtención de una radiografía de tórax se pueda diferenciar. Causas de origen extrarrespiratorio, como una descompensación de la insuficiencia cardíaca, un edema agudo de pulmón o una anemia también podrían estar incluidos en la definición de exacerbación. Por ello aunque las definiciones tienen utilidad es conveniente tener en cuenta sus limitaciones y utilizar el juicio clínico para realizar un correcto diagnóstico diferencial.

1.2.2. Características

El riesgo de exacerbación está incrementado en los enfermos con mayor gravedad de la EPOC medida con el FEV₁, aunque no existe una relación lineal entre el riesgo de exacerbaciones y el grado de obstrucción bronquial. Así en uno de los estudios más importantes en la última década sobre exacerbaciones en la EPOC (14) un 22% de enfermos en estadio GOLD II reportaron exacerbaciones frecuentes frente a un 47% de los enfermos en estadio GOLD IV. Se consideró exacerbador frecuente a aquellos enfermos con ≥ 2 exacerbaciones/año y únicamente se incluyeron en el estudio las exacerbaciones graves (ingreso hospitalario o necesidad de antibiótico y/o corticoides). Aunque la relación con la obstrucción bronquial quedó bien establecida, una quinta parte de los pacientes con obstrucción moderada también sufrieron exacerbaciones mientras que la mitad de los muy graves experimentaron < 2 exacerbaciones/año.

En estos enfermos las exacerbaciones pueden aparecer agrupadas en períodos de tiempo o *cluster* de acuerdo con los resultados de Hurst *et al.* (15); en este trabajo un 37% de las exacerbaciones fueron recurrentes, es decir aparecían 1 o más agudizaciones después de una inicial, en el intervalo de 8 semanas. Esta forma apareció con más frecuencia en enfermos exacerbadores.

En cuanto a la presentación clínica, se han caracterizado dos clases de episodios, uno más agudo y sintomático y otro más insidioso y de recuperación más lenta. El primero se presentó en más del 50% de las 1995 agudizaciones que requirieron atención médica en una cohorte de 250 pacientes seguidas durante 2-3 años (16). La expectoración purulenta y los síntomas de vías altas se asociaron de forma estadísticamente significativa a las presentaciones agudas.

En general los pacientes con más agudizaciones presentan peor calidad de vida, mayor caída del FEV₁, más inflamación de la vía aérea y sistémica así como más riesgo de colonización (17). Asimismo representan un reto para el sistema sanitario al copar la mayoría de ingresos hospitalarios debido a agudización de EPOC. Así en el estudio POET realizado con una cohorte de más de 7000 enfermos, un 13% de los enfermos incluidos eran exacerbadores pero sin embargo supusieron el 57% de los ingresos hospitalarios por agudización (18).

Aunque la definición de exacerbador frecuente es variable entre los estudios dependiendo de si se utiliza definiciones basadas en la utilización de recursos sanitarios o en los datos proporcionados por cuestionarios (19) es importante destacar que todas las agudizaciones tienen influencia en la calidad de vida y el empeoramiento de la función pulmonar. Así en el estudio ATTAIN (20) llevado a cabo en una cohorte de enfermos moderados-graves, se observó un descenso más acelerado del FEV₁ y una recuperación clínica más lenta en las exacerbaciones no reportadas comparadas con las reportadas por el enfermo, al menos a corto y medio plazo.

1.3. Etiología de las exacerbaciones

En general se acepta que hasta en un 70% de las agudizaciones están implicadas bacterias o virus, mientras en el resto, las causas serían indeterminadas (21). Las bacterias implicadas son principalmente *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catharralis* y *P. aeruginosa*, mientras que entre los virus destaca principalmente rinovirus, virus de la gripe y virus respiratorio sincitial (VRS).

La demostración de causalidad ha sido muy debatida en los últimos años, pero actualmente existe consenso suficiente para establecer un nexo entre agudización y microorganismo.

Este debate fue debido en primer lugar a las propias técnicas de obtención de muestras; las muestras respiratorias aunque fáciles de obtener, presentan el problema del riesgo de contaminación en el trato respiratorio superior. Por ello tanto en el ámbito extrahospitalario como hospitalario se han usado técnicas invasivas broncoscópicas para obtener muestras representativas del tracto respiratorio inferior, especialmente el lavado broncoalveolar (BAL) y el catéter telescópico protegido. La dificultad principal estriba en que no son inocuas y tiene riesgo para el paciente, lo que restringe su utilización en la práctica clínica diaria. Sin embargo, se ha podido establecer una buena concordancia entre los cultivos procedentes de muestras invasivas y el cultivo de esputo, aunque la sensibilidad de este último fue inferior (22).

Asimismo existe el problema de la especificidad y sensibilidad del cultivo tradicional que puede ser mejorada con las nuevas técnicas basadas en el análisis del gen de la subunidad pequeña ribosómica 16S ARNr que es un componente altamente conservado de los ribosomas de procariontes. Los métodos de secuenciación basados en el gen 16S ARNr se basan en una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento del gen mediante cebadores universales diseñados para unirse a las regiones conservadas del gen (23). Estas técnicas son más sensibles que los cultivos convencionales, sin embargo esto dificulta la interpretación cuando las cargas son bajas e incrementa el riesgo de contaminación; asimismo en el mejor de los casos se llega a identificar la especie pero no los serotipos.

Teniendo en cuenta estas limitaciones se han establecido dos situaciones relacionadas con la infección que son la presencia de gérmenes en estabilidad clínica (colonización) y la detección de microorganismo en agudización.

1.3.1. Colonización bacteriana

La presencia de bacterias en el tracto respiratorio inferior es conocida con el término colonización con un significado, que podría inducir a pensar en ausencia de significación patológica, sin embargo existen estudios que demuestran una estrecha relación entre la presencia de gérmenes y el grado de inflamación de la vía aérea, teniendo además consecuencias clínicas. Por ello algunos autores abogan por el uso del término infección bronquial crónica (24) en lugar de colonización, término que se debería reservar para aquellos gérmenes verdaderamente comensales o no patógenos.

El tabaquismo activo (25), el deterioro grave de la función pulmonar (26, 27), las comorbilidades (28), las exacerbaciones frecuentes (25), la presencia de bronquiectasias (25), la expectoración purulenta (28), el aumento de la disnea (28) y el uso de corticoides inhalados en dosis altas (27) se han relacionado con una mayor frecuencia de infección bronquial crónica en la EPOC.

Las bacterias más frecuentemente aisladas son *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. parainfluenzae* y *Pseudomonas* spp (25,28).

Actualmente existe evidencia de que el fenómeno inflamatorio producido en la colonización no es únicamente local sino también sistémico, así en el estudio de Marín *et al.* (25) se observó que la colonización por *H. influenzae* condicionó una mayor respuesta inflamatoria sistémica, determinada por proteína C reactiva, que en los no colonizados. Los enfermos colonizados tenían una mediana de 6 mg/L frente a 3,5 mg/L en los no colonizados ($p=0,016$). Asimismo, una tercera parte de los enfermos colonizados presentaban valores por encima de 7,06 mg/L, valor establecido como factor de riesgo cardiovascular (29).

En otros estudio basados en técnicas de microbioma se ha confirmado que la colonización por *H. influenzae* fue la más frecuente, (aunque no se evaluó la presencia de *P. aeruginosa*) hallándose hasta en el 60% de los pacientes con EPOC grave y que la inflamación de la vía aérea correlacionó con la carga bacteriana (30).

1.3.2. Exacerbación por bacterias

La adquisición de una nueva cepa o serotipo se ha propuesto como mecanismo principal de agudización por parte del grupo de Sethi *et al.* (31). En este primer estudio el aislamiento de una nueva cepa se asoció a un mayor riesgo de exacerbación; el 33% de las visitas médicas en las que se aisló una nueva cepa se asoció con clínica de exacerbación frente al 15,4% en los que no se observó una nueva cepa ($p < 0,001$).

El riesgo relativo se cuantificó para los diversos gérmenes hallados, así el aislamiento de nuevas cepas de *M. catarrhalis* se asoció con un riesgo relativo de 2,96 y en el caso de *S. pneumoniae* de 1,77 de sufrir exacerbación (31). En el caso de *P. aeruginosa* no se documentó esta asociación aunque en posteriores estudios se estableció relación entre nuevas cepas y agudización (32). Más recientemente el mismo grupo detectó que muchas cepas identificadas como *H. influenzae*, correspondían en realidad *H. haemolyticus* distinguiéndose ambos en su respuesta inflamatoria, elevada en el caso de *H. influenzae* y prácticamente irrelevante en el caso de *H. haemolyticus*, por lo que cabe considerar este último como un verdadero comensal. De hecho la reevaluación de los resultados en el caso de *H. influenzae*, demostró que en un 44,5% de las visitas en las que se detectaba una nueva cepa, el enfermo estaba exacerbado frente al 16% de exacerbaciones sin detección de nueva cepa, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (33).

Sin embargo en el estudio mencionado al inicio de esta sección, en un porcentaje importante de casos el hallazgo de nuevas cepas no se relacionó con síntomas respiratorios sugestivos de infección (31), lo que hace pensar que no es el único mecanismo para explicar la agudización en estos enfermos. Así el mecanismo del “fall and rise” ha cobrado nueva vigencia como explicación de los mecanismos de agudización. Este mecanismo propone la existencia de un incremento de la carga de un microorganismo previamente presente en la vía aérea, es decir son los mismos microorganismos que colonizan los que aumentan su carga y condicionan una respuesta inflamatoria y un empeoramiento clínico. Este mecanismo se ha documentado en estudios basados en la obtención de muestras broncoscópicas (26), exceptuando los

aislamientos de *P. aeruginosa*, cuya presencia se asociaba a exacerbación independientemente de la carga bacteriana. Estudios recientes, basados en la utilización de técnicas de biología molecular para la detección e identificación de las especies bacterianas, como los realizados por Garcha *et al.* (27) y Molyneaux *et al.* (34), apoyan esta hipótesis. Estos autores observaron durante los periodos de agudización, un aumento de la carga bacteriana de las especies ya presentes en fase estable.

El mecanismo por el cual existe un paso de colonizado a agudizado no queda claro en la literatura, pero cada vez existe más evidencia del papel de los virus respiratorios como precipitantes de la agudización, así Molyneaux *et al.* (34) demostraron crecimiento bacteriano, especialmente *H. influenzae*, en enfermos con EPOC previamente colonizados por este germen, después de la infección con rinovirus.

Por otra parte las bacterias atípicas no parecen tener un rol relevante de acuerdo con los resultados obtenidos mediante técnicas basadas en RT-PCR (27,35). En estos estudios no llegó a detectarse ninguno de estos microorganismos ni en fase estable ni en agudización.

1.3.3. Colonización vírica

Existe poca información sobre persistencia de virus en el árbol bronquial y la poca evidencia está más relacionada con VRS y adenovirus como marcadores de mala evolución de la EPOC. Sin embargo, sí que parece existir una cierta asociación entre exacerbación recurrente e infección vírica (36).

En un estudio caso-control realizado en 40 enfermos, 20 con obstrucción bronquial y 20 sin obstrucción bronquial, se observó, en el tejido pulmonar, DNA de adenovirus virus en mayor número de casos en los obstructivos que en los no obstructivos (37). Asimismo, se ha documentado en un estudio realizado con cobayas expuestas al humo de cigarrillo la aparición de enfisema, que era más grave si concomitantemente se infectaban con adenovirus (38). En relación con VRS, en un estudio longitudinal con 74 pacientes EPOC se detectó VRS en más de dos ocasiones en esputo en 18

enfermos; mostrando estos enfermos mayor grado de inflamación de las vías aéreas y una caída del FEV₁ más pronunciada (39).

En general con los datos disponibles no queda claro el significado del hallazgo de virus en fase estable ni su influencia en evolución de la EPOC.

1.3.4. Exacerbación por virus

Con la mejora de las técnicas diagnósticas, especialmente con generalización del uso de técnicas basadas en biología molecular como la PCR, se ha mejorado la sensibilidad de los test, pudiendo detectarse virus entre 47-56% de los episodios (40).

Los virus más frecuentemente aislados en exacerbación han sido principalmente rinovirus y a cierta distancia otros virus como influenza, parainfluenza, VRS y metapneumovirus (41).

A pesar del hallazgo de virus en secreciones respiratorias, su papel como agente causal o promotor de infección bacteriana no ha sido establecido hasta estudios recientes. En este sentido uno de los primeros estudios en demostrar patogenicidad del rinovirus fue el de Wilkinson *et al.* (42), que comprobó que la combinación de rinovirus con *H. influenzae* producía mayor respuesta inflamatoria que aquellos episodios sin infección vírica; asimismo la gravedad del episodio fue mayor (42).

En un elegante estudio de Mallia *et al.* (43), se observó cómo tras la instilación experimental de rinovirus en pacientes afectos de EPOC, se producían síntomas compatibles con agudización y en un 60% de los enfermos se producía crecimiento bacteriano a los 15 días de la instilación, hecho que concuerda con la experiencia clínica relatada por los propios pacientes. La carga vírica aumentó después de la instilación, alcanzado el máximo pico entre los 5-9 días de la instilación lo que confirma que los virus eran viables. La infección vírica se acompañó de elevación de mediadores de inflamación independientemente del crecimiento bacteriano posterior, lo que confirma al rinovirus como causa de agudización.

En otro estudio más reciente y no experimental realizado en 77 pacientes con EPOC se comprobó una clara relación entre infección vírica y síntomas de vía aérea alta. Asimismo se estableció un incremento de la carga vírica en agudización comparado con la fase de estabilidad clínica (44).

1.4. Respuesta inflamatoria y microorganismo

Las exacerbaciones en la EPOC están asociadas con la inflamación ya sea sistémica como en vía aérea. Marcadores como el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6), proteína C reactiva, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos han sido estudiados pero muy pocos estudios han tratado de relacionar patrón inflamatorio y germen causal (40). En este sentido existen estudios que han mostrado que las exacerbaciones causadas por virus producen mayor sintomatología, caídas de la función pulmonar e incremento de IL-6 e interleucina 10 (IL-10) (36, 45-47), mientras que en otros esto se relacionaba con la infección bacteriana (42, 48-50), pero con la limitación de no haber testado bacterias en esputo en los primeros, ni virus en los segundos.

Los estudios comparando la etiología vírica frente a la bacteriana han concluido con resultados contradictorios; así la presencia de bacterias, pero no de virus se asoció con marcadores de inflamación de la vía aérea aumentados, en concreto los neutrófilos, IL-8 y TNF-alfa (51,52). Por otra parte Papi *et al.* (53) no observaron diferencia alguna entre la infección vírica y la bacteriana tanto en el tipo de inflamación como en las características clínicas (purulencia del esputo), aunque la presencia de eosinófilos se incrementó significativamente en las agudizaciones inducidas por virus.

Sin embargo Bafadhel *et al.* (54) identificaron la eosinofilia en esputo como marcador de un fenotipo no necesariamente asociado a infección vírica o bacteriana y que se podría beneficiar de tratamiento con corticoides.

En un reciente estudio (55) enfocado específicamente en inflamación sistémica y realizado en enfermos ingresados, se detectaron niveles más elevados de proteína C reactiva en aquellos casos en que la infección vírica fue la causa y

además esta correlacionó con la presencia de fiebre, contrariamente a los casos con aislamiento de bacterias.

Todos estos datos contrastan con estudios realizados en enfermos con neumonía en los que la infección vírica se suele asociar a menor respuesta inflamatoria. En un estudio con 654 neumonías (56) en los que se analizaron diversos biomarcadores sistémicos y locales se observó una mayor respuesta inflamatoria en los casos en que *S. pneumoniae*, Enterobacterias y *L. pneumophila* estaban implicados, mientras los casos producidos por virus y bacterias atípicas presentaban la respuesta inflamatoria más baja de todos los microorganismos analizados.

En exacerbaciones bacterianas de la EPOC no existen estudios comparativos entre las diferentes bacterias y los resultados difieren según el estudio. Así, hay autores que reportan los valores más elevados de proteína C reactiva en agudizaciones debidas a *S. pneumoniae* y *S. aureus* (57,58), mientras que otros refieren los valores más elevados en agudizaciones por *H. influenzae* y *M. catarrhalis* (50).

1.5. Gravedad de la exacerbación

La gravedad de una agudización está influenciada por estado basal de los enfermos y la intensidad de la noxa causante. De esta forma los pacientes que presentan mayor gravedad de su obstrucción o un índice de BODE más elevado o comorbilidades graves, presentan más riesgo de muerte en caso de exacerbación. Las exacerbaciones producen inflamación de la vía aérea, aumento de las secreciones bronquiales, broncoespasmo y todo ello conduce a un deterioro gasométrico que puede conducir a una insuficiencia respiratoria hipoxémica o hipercápnic. En los casos más graves el enfermo puede requerir asistencia ventilatoria (59).

En las guías clínicas más antiguas la gravedad de la exacerbación se ha estratificado por niveles, así nivel I correspondería a aquella agudización que se puede tratar ambulatoriamente, nivel II aquella que precisa ingreso hospitalario y nivel III aquella que requiere una unidad de cuidados intensivos

(60). Aunque la clasificación es obvia, no ha sido hasta hace pocos años que guías como la GesEPOC (9) han tratado de establecer algoritmos útiles en la valoración de la gravedad. Sin embargo existen pocos estudios de cohortes bien caracterizados en los que se analicen todas las variables potencialmente asociadas a gravedad. Así, en el metaanálisis de Franciscosi *et al.* (61) en el que se analizan 268 estudios que incluyen 142.317 pacientes con EPOC, únicamente se pudo establecer la hipercapnia y la frecuencia respiratoria como marcadores de gravedad del episodio. En este metaanálisis se relacionaron, entre otros, parámetros fisiológicos, biomarcadores y comorbilidades con la gravedad de la exacerbación estratificada en 3 niveles: atención ambulatoria, atención hospitalaria o requerimiento de ingreso en UCI. Como limitación del estudio fue la falta de datos suficientes de algunos parámetros analizados como por ejemplo y especialmente los biomarcadores (61).

Más recientemente en una cohorte de 2487 pacientes con EPOC atendidos en los Servicios de Urgencias de varios centros españoles se ha tratado de identificar aquellos parámetros objetivos relacionados con la gravedad del proceso. Aunque con limitaciones por datos incompletos, se concluyó que la PaO₂ por debajo de 60 mmHg y la PaCO₂ por encima de 45 mmHg fueron factores independientes asociados a la necesidad de ingreso hospitalario junto a otros como ingresos previos y disnea de reposo. Sin embargo en relación con el riesgo de muerte, la adición de estos parámetros fisiológicos no aportó más precisión al modelo (62,63).

1.5.1. Biomarcadores de gravedad

Un biomarcador es "una característica biológica, medida objetivamente (es decir, con precisión y reproducibilidad aceptables) y que se utiliza como un indicador de un proceso fisiológico o patológico, o de la actividad de un medicamento " (64).

Los biomarcadores pueden tener una función diagnóstica, pero también pronóstica, en el sentido de establecer valores asociados a determinados *outcomes* que permiten estratificar el riesgo de determinado evento.

De este modo existe bibliografía extensa en la relación de diversos marcadores en la fase estable de la EPOC y predicción de mortalidad o detección de riesgo de exacerbación. Así, en una cohorte de 1774 enfermos con EPOC seguido durante 3 años un subgrupo de pacientes con EPOC (16%) demostró inflamación sistémica persistente con ≥ 2 marcadores biológicos (recuento de leucocitos, proteína C reactiva, IL-6, o fibrinógeno) en el primer cuartil después de 1 año de seguimiento, lo cual se asoció con un aumento en la frecuencia de exacerbación y un aumento de la mortalidad (65). En otro estudio con 6574 afectados de EPOC la elevación de la proteína C reactiva (> 3 mg/L), del fibrinógeno (> 14 μ mol/L) y de la cifra total de leucocitos ($> 9 \times 10^9$ /L) se asoció con un riesgo de exacerbación el primer año de seguimiento 3,7 veces mayor que enfermos con los tres biomarcadores por debajo del punto de corte establecido (66).

En cuanto a la valoración de gravedad de las agudizaciones, los resultados son dispares. Así, en un estudio ya clásico se evaluó la capacidad de 36 biomarcadores para confirmar la presencia de exacerbación y su gravedad determinándose que únicamente la proteína C reactiva fue la más útil. Aun así, con un punto de corte de 5 mg/L su sensibilidad fue del 76% y su especificidad del 57,5%; en cuanto a la gravedad no demostró ser de utilidad clínica (51). Por otra parte, la gravedad de la exacerbación no se pudo establecer por la magnitud de la elevación de ninguno de los biomarcadores analizados.

Otros biomarcadores como la coceptina, también ha sido objeto de estudio mostrándose superior a proteína C reactiva y procalcitonina en cuanto a capacidad de predicción de mortalidad intrahospitalaria o aumento de la estancia media, independientemente de la función pulmonar y comorbilidades asociadas (67). En este estudio un punto de corte de > 40 pmol/l se relacionó con un incremento de la estancia hospitalaria de 5 días. Actualmente está siendo estudiado como biomarcador de severidad y estratificación de riesgo tras distintas afectaciones cardíacas.

El amiloide A sérico es una proteína producida en el hígado, de fase aguda indicadora de inflamación, ya que su secreción es inducida por mediadores inflamatorios como son IL-6, interleucina 1beta (IL-1beta) y TNF-alfa, que están

elevados durante la exacerbación de la EPOC. El valor de este marcador viene determinado por su elevación durante la exacerbación, llegando hasta cuatro veces su valor en exacerbaciones graves. Es más sensible que la proteína C, sola o en combinación con la disnea para exacerbaciones graves (68). En este estudio, la procalcitonina no tuvo ninguna utilidad ni en el diagnóstico de exacerbación ni en la evaluación de la gravedad.

Encontrar un biomarcador sensible y específico eliminaría la variabilidad existente a la hora de definir la gravedad de un episodio de exacerbación y permitiría estratificar de forma adecuada la gravedad de los episodios que posteriormente permitieran comparar los resultados de los diferentes estudios.

1.6. Cobertura antibiótica de la exacerbación

Desde el estudio original de Anthonisen (12) en que se demuestra la utilidad del tratamiento antibiótico cuando el paciente presenta agudizaciones tipo I, ha existido mucho debate en cuanto al riesgo-beneficio del tratamiento antibiótico, principalmente debido a falta de marcadores de infección bacteriana específicos y a la controversia sobre la patogenicidad de los diferentes microorganismos hallados en el esputo.

Sin embargo los metaanálisis más recientes parecen clarificar las indicaciones del tratamiento antibiótico; así Puhan *et al.* (69) analizaron 13 ensayos clínicos que incluyeron 1557 enfermos, observándose mayor eficacia del antibiótico en función de la gravedad de la exacerbación. En los episodios más leves aquellos de manejo ambulatorio la tasa de fracasos fue similar a los episodios no tratados con antibiótico, al contrario que las exacerbaciones que requirieron ingreso hospitalario. Estos resultados se superponen a una reciente revisión Cochrane, aunque en esta última el tratamiento antibiótico no parece mejorar la mortalidad ni la estancia hospitalaria en pacientes hospitalizados (70).

Por otra parte la selección del antibiótico puede tener influencia en la tasa de fracasos terapéuticos; así en un estudio comparativo entre amoxicilina-clavulánico y moxifloxacino realizado en 1352 enfermos con EPOC moderado-grave ($FEV_1 < 60\%$), moxifloxacino demostró menor tasa de fracaso terapéutico

a las 8 semanas postratamiento que los enfermos tratados con amoxicilina-clavulánico (71).

Hoy día existe evidencia suficiente para tratar con antibióticos las agudizaciones de la EPOC en las que se cumplen los criterios de Anthonisen, especialmente en exacerbaciones moderadas o graves. Asimismo existe consenso en la cobertura antibiótica en exacerbaciones muy graves y aquellas que llevan a los enfermos ser intubados, aunque no se cumpla con los criterios arriba señalados. En enfermos tratados ambulatoriamente el tratamiento antibiótico estaría indicado cuando se cumpla los tres criterios de Anthonisen (9).

1.6.1. Factores de riesgo de *P. aeruginosa*

La cobertura antibiótica empírica debe cubrir gérmenes como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *M. catharralis*, pero la posibilidad de infección por *P. aeruginosa* no es despreciable dado que un tratamiento inadecuado puede conllevar un riesgo para el paciente. Por ello muchas guías recomiendan algoritmos basados en factores de riesgo conocidos pero que no están validados. Así en las guías europeas (72) se propone un algoritmo no validado de 4 puntos, de los que si se cumplen 2 es suficiente para tratar con cobertura antipseudomónica. La obstrucción grave ($FEV_1 < 30\%$), la hospitalización reciente, el uso de corticoides durante las semanas previas al episodio y el recibir 4 tandas antibióticas durante el año previo o tratamiento antibiótico en los 30 días previos se consideran factores de riesgo de infección por *P. aeruginosa*. En la guía Gesepoc se consideran factor de riesgo la presencia de obstrucción grave ($FEV_1 < 50\%$), más de 4 tandas antibióticas, la presencia de bronquiectasias significativas o el aislamiento de *P. aeruginosa* previa ya sea en fase estable como en agudización.

En general el riesgo está asociado a la gravedad de la obstrucción bronquial, siendo los de mayor riesgo aquellos con $FEV_1 < 50\%$ (73) y especialmente cuando el $FEV_1 < 35\%$ (74). Desde entonces en los pocos estudios realizados se han identificado otros potenciales factores de riesgo como, el uso previo de

antibióticos, la falta de vacunación antigripal, el aislamiento previo de *P. aeruginosa*, la hospitalización previa y el tratamiento con corticoides (75-77).

Los enfermos con infecciones por *P. aeruginosa* presentan mayor mortalidad (78) especialmente si este microorganismo es multirresistente (79).

1.6.2. Biomarcadores y tratamiento antibiótico

La vaguedad de la definición de exacerbación del EPOC que se propone en las guías clínicas y el conocimiento de que la mayoría de exacerbaciones ocurren como fenómeno inflamatorio ha promovido la búsqueda de marcadores sensibles y específicos que mejoren la precisión de la definición clínica de exacerbación.

Probablemente el biomarcador más utilizado sea la purulencia del esputo; ésta ha correlacionado con la presencia de bacterias ya sea en agudización (80,81) como en fase estable (28). En el estudio de Daniels *et al.* (80) la purulencia correlacionó asimismo con la elevación de la proteína C reactiva. Como limitación de estos estudios es de señalar que en ninguno de ellos se investigó la presencia de virus como causa de la agudización.

A la hora de mejorar la precisión cuando se indica un antibiótico, aparte de los datos clínicos como la purulencia del esputo existe la posibilidad de utilizar otros biomarcadores. Entre los biomarcadores más estudiados destaca la proteína C reactiva. La proteína C reactiva es una proteína sintetizada en el hígado que muestra marcada variabilidad intra e interindividual pero en población sana los valores se encuentran habitualmente por debajo de 1 mg/L. Ante un estímulo, aumenta entre 4-6 horas después de producido éste, llegando a la respuesta máxima a las 48 horas. La velocidad de producción es el principal determinante de las diversas patologías (82). El potencial uso como biomarcador de infección bacteriana puede estar alterado por el hecho de hallarse elevado en estado estable y es una de las potenciales limitaciones que presenta.

En un estudio aleatorizado comparando tratamiento antibiótico con doxiciclina vs placebo, los valores de proteína C reactiva por encima de 50 mg/L se asociaron con mejor respuesta al antibiótico comparado con placebo, aunque no llegó a ser significativa estadísticamente. En el mismo estudio la procalcitonina no fue lo suficientemente sensible en la detección de respuesta de la infección al antibiótico (83).

En otro estudio realizado con pacientes ingresados por agudización grave se aleatorizaron en función de purulencia del esputo; aquellos con esputo purulento recibieron tratamiento antibiótico y el resto no. El esputo purulento se asoció con valores más altos de proteína C reactiva, mientras que procalcitonina no mostró diferencias entre ambos grupos. No hubo diferencias en las tasas de fracaso clínico entre los dos grupos (84).

Otros estudios basados en la utilización de la procalcitonina como indicador de antibioterapia han mostrado la utilidad de este biomarcador en reducir la necesidad de tratamiento antibiótico en infección respiratoria baja (85). Este mismo grupo (86) llevó a cabo otro estudio únicamente en pacientes con EPOC demostrando una reducción del 32% en los antibióticos prescritos en el grupo de procalcitonina respecto al grupo estándar. No hubo diferencias en otros *outcomes*. Curiosamente no hubo relación alguna con la purulencia del esputo, ni la clasificación de Anthonisen, ni tampoco con la presencia de bacterias en el cultivo.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Esta tesis pretende profundizar en el estudio de las exacerbaciones de causa infecciosa en la población EPOC grave que es el grupo de enfermos que presenta más riesgo y mayor gravedad cuando la exacerbación aparece. Aunque existe abundante bibliografía sobre dicho tema faltan estudios clínicos en enfermos graves que incluyan todas las posibles causas de infección y que sean seguidos durante un tiempo suficientemente prolongado. Asimismo en un escenario real como el que se propone en esta tesis (enfermos atendidos ambulatoriamente y por el mismo equipo asistencial) se tratará de evaluar la importancia de un biomarcador como la proteína C reactiva en las agudizaciones, dado que en estudios previos los resultados son contradictorios, especialmente debido a diseños dispares y metodología diversa.

Establecer que gérmenes son los principales causantes de la exacerbación y medir su impacto en la gravedad mediante un marcador de inflamación fácil de determinar como la proteína C reactiva permitirá proponer medidas preventivas en estos enfermos.

Este grupo de enfermos presentan además, mayor riesgo de infecciones por microorganismos poco habituales, especialmente *P. aeruginosa*, precisando un tratamiento antibiótico específico dado que suelen ser resistentes a los antibióticos de uso habitual

Los factores de riesgo de infección *P. aeruginosa* no están suficientemente establecidos en la literatura. Así, la presencia de bronquiectasias como comorbilidad podría estar relacionada con este riesgo o bien ser un factor de confusión en la utilización de antibióticos. Asimismo conocer la prevalencia de colonización por este germen y sus factores asociados permitirá plantear estrategias terapéuticas que lo eviten o modulen al igual que ya se realiza en los enfermos con fibrosis quística.

3. HIPÓTESIS

1. La gravedad de las exacerbaciones de causa infecciosa está relacionada con el microorganismo causal en población con EPOC grave. La determinación de la Proteína C reactiva en sangre puede ser útil para valorar la gravedad de la exacerbación y orientar sobre la etiología de la misma.
2. En enfermos EPOC con $FEV_1 < 50\%$, el riesgo de exacerbación por *Pseudomonas aeruginosa* puede estar relacionado con la utilización previa de antibióticos.
3. La presencia de bronquiectasias crípticas puede facilitar la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en estos pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1. Estudio 1: Etiología y respuesta inflamatoria en las exacerbaciones de los enfermos con EPOC grave

- a) Determinar la etiología de las exacerbaciones infecciosas en una cohorte de enfermos con EPOC grave.
- b) Relacionar la etiología de la exacerbación y la respuesta inflamatoria medida mediante la proteína C reactiva.
- c) Valorar la influencia de la respuesta inflamatoria medida mediante la proteína C reactiva en la gravedad de la exacerbación.

4.2. Estudio 2: Factores de riesgo de infección por *P. aeruginosa* en la EPOC grave

- a) Estudiar los factores de riesgo de aislamiento de *P. aeruginosa* en esta población. Influencia de las bronquiectasias.
- b) Evaluar la prevalencia de colonización por *P. aeruginosa* en dicha población.
- c) Conocer la caracterización microbiológica de las cepas de *P. aeruginosa*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

Estudio observacional y prospectivo realizado a partir de una cohorte de pacientes con EPOC atendidos de forma regular en el hospital de día de enfermedades respiratorias, visitándose tanto de forma programada como de forma espontánea cuando se exacerbaban.

La definición de EPOC se realizó, de acuerdo con la guía GOLD, por la existencia de una relación entre FEV₁ y FVC post-broncodilatador inferior a 0,7, en un paciente con un hábito tabáquico de más de 10 paquetes-año (1).

El estudio se desarrolló entre los meses de enero del 2005 y marzo del 2008, realizándose un seguimiento mínimo de 1 año. Esta cohorte incluyó a pacientes con EPOC grave, definida por la presencia de un FEV₁ posbroncodilatador por debajo del 50% del valor de referencia y que habían sufrido 3 o más exacerbaciones graves durante el año previo a la inclusión. Los pacientes recibieron educación en el autocuidado de la enfermedad y un plan de acción personal, que incluyó visitas no programadas en la unidad cuando aparecían síntomas de exacerbación.

5.2. Criterios de inclusión: se incluyeron las exacerbaciones de la EPOC (AEPOC) de causa potencialmente infecciosa, que cumplieran con 2 o más de los 3 criterios clásicos de Anthonisen (12).

5.3. Criterios de exclusión: pacientes <40 años de edad, pacientes previamente diagnosticados de bronquiectasias en vista de los síntomas y las radiografías de tórax, pacientes diagnosticados de asma, fibrosis quística o neoplasia activa, pacientes en tratamiento crónico con corticosteroides orales o fármacos inmunosupresores por cualquier motivo y aquellos pacientes en tratamiento con antibióticos sistémicos o inhalados a largo plazo.

En todos los episodios se registraron los síntomas agudos, incluyendo los síntomas del tracto respiratorio superior (congestión nasal, rinorrea, odinofagia), junto con la fiebre, la frecuencia respiratoria y la saturación de la

oxihemoglobina (Sat O₂). Se realizó también una radiografía de tórax, con el objetivo de descartar neumonía. En todos los casos se obtuvo una muestra de esputo espontáneo antes de la administración de antibióticos y una analítica de sangre que incluyó hemograma, función renal, electrolitos y niveles de proteína C reactiva, así como una gasometría arterial cuando se consideró necesario. Las decisiones relacionadas con el tratamiento y la necesidad de ingreso hospitalario fueron tomadas por el médico responsable, de acuerdo con las guías internacionales vigentes durante el periodo de realización del estudio (1,72, 60).

Las exacerbaciones en las que se administraron antibióticos o corticosteroides en los días previos al episodio (<5 días) fueron excluidas del análisis final (15).

5.4. Microbiología

5.4.1. Cultivo bacteriológico

Se recogieron muestras de esputo en cada exacerbación y en estabilidad clínica (al menos un mes después del episodio de exacerbación) siempre y cuando el enfermo fuera capaz de expectorar espontáneamente. Todas las muestras se procesaron dentro de los 60 minutos posteriores a su obtención. De cada una de ellas se separó una alícuota para congelación y conservación (-80C°).

Se utilizaron los criterios de Murray-Washington para la selección de muestras representativas de secreciones bronquiales (87). Las muestras de esputo clasificadas como Murray IV-V se cultivaron para el aislamiento de gérmenes potencialmente patógenos (PMP) en medios generales y selectivos de acuerdo con métodos estándar; los cultivos se consideraron positivos cuando se observó crecimiento de dichos microorganismos (88). Brevemente, las muestras se agitaron en vórtex durante 30-60 segundos después de la homogeneización con N-acetilcisteína. Se cultivaron 10 µL de la solución obtenida en agar sangre, agar sangre con ácido nalidíxico, agar chocolate y agar McConkey. Todas las placas se incubaron en estufa a 35 °C en atmósfera con 5% de dióxido de carbono (agar MacConkey en atmósfera aerobia) y la lectura se realizó a las 24 y 48 horas. Las bacterias gramnegativas

y grampositivas reconocidas como agentes causantes de infecciones respiratorias, tales como *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *Enterobacteriaceae* fueron considerados como PPMs (89).

El número de unidades formadoras de colonias por mililitro de esputo (ufc/mL) se calculó a partir del número de colonias obtenidas y la dilución. Los datos se expresaron como el recuento total de bacterias en logaritmo en base 10.

5.4.2. RT-PCR para detección de virus

El ADN / ARN viral se extrajo a partir de 200 µL de muestras clínicas respiratorias previamente licuados con Sputasol® en un baño de agua (37° C) durante 20 minutos. Entonces, se siguió el método de extracción de RNA/DNA, QIAmp MinElute Virus Spin según el kit QIAcube® (Qiagen, Hilden, Alemania) obteniéndose 50 µL de elución de ácido nucleico. Se utilizó un ensayo de RT-PCR multiplex para la detección simultánea de virus parainfluenza (1, 2, 3, 4AB), coronavirus humano 229E y OC43, enterovirus, rinovirus, virus de la gripe A, B, C, virus respiratorio sincitial (VRS) y de adenovirus siguiendo el procedimiento descrito por Coiras et al. (90).

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *P. aeruginosa* se realizaron mediante microdilución en caldo de acuerdo con los procedimientos del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (91).

5.4.3. Genotipado de *P. aeruginosa*

Las cepas de *P. aeruginosa* se congelaron a -80 ° C y posteriormente se genotiparon. La relación genética de la cepas de *P. aeruginosa* se evaluó mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), usando el método de Durmaz et al modificado (92). Se preparó ADN genómico después de la centrifugación de 1 mL de una solución de 1,5 McFarland obtenido a partir de cultivos frescos sembrados en placas de agar sangre. Los sedimentos se resuspendieron en 120 µL de tampón de suspensión (CSB; 100 mM de Tris-HCl [pH 8,0], EDTA 10 mM) y se mezclaron con un volumen igual de de

agarosa líquida (55 °C) InCert® 2% (Lonza) preparado en CSB con 1 % de sulfato dodecil de sodio (SDS). La digestión del ADN se realizó con 30 U de enzima de restricción *SpeI* (New England Biolabs) y se incubó a 37 ° C durante 17 horas. El ADN digerido se sometió a electroforesis en un sistema CHEF-DR III (Bio-Rad) con los siguientes parámetros de funcionamiento: 6 V / cm a 14°C con pulso de tiempo de 5 a 25 segundos, durante 20 horas. Los geles se tiñeron con SYBR Seguro (Invitrogen) y se documentan en un ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare). Las imágenes del gel se analizaron utilizando el software InfoQuest™ FP versión 4.5 (Bio-Rad, Laboratories)

La correlación entre las bandas se llevó a cabo teniendo en base al coeficiente de correlación de Dice, y el árbol filogenético se obtuvo con el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method). En el dendograma se consideró, que los aislados que presentaban una similitud > 90% correspondían al mismo pulsotipo.

5.4.4. Definiciones

La interpretación de los resultados de microbiología se realizó en base a las siguientes definiciones:

5.4.4.1. Colonización crónica por *P. aeruginosa*: El aislamiento de *P. aeruginosa* en tres o más cultivos de esputo consecutivos, separados al menos por un mes, durante un período de 6 meses, se consideró como colonización crónica por este MPP, independientemente de su recuperación de los períodos de exacerbación o estabilidad (93).

5.4.4.2. Multirresistencia: La multirresistencia (MDR) en *P. aeruginosa* se definió como la resistencia a tres o más grupos de antibióticos generalmente activos contra el MPP, incluyendo beta-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), carbapenems, quinolonas o aminoglucósidos, polimixinas y monobactams (94).

5.5. Evaluación radiológica de las bronquiectasias

La evaluación de la presencia y extensión de las bronquiectasias se realizó en estabilidad clínica del paciente. Se utilizó un equipo de tomografía computarizada multidetector (TCMD) (Siemens Sensation 16, Erlangen, Alemania). Se obtuvieron imágenes de alta resolución (TACAR), con apneas en inspiración forzada, en posición supina, desde el vértice pulmonar al diafragma. Se realizaron cortes finos (de 1 mm de grosor a intervalos de 10 mm) con los siguientes parámetros: 120 kVp, 250 mA y 1 segundo de tiempo de exploración. Las imágenes fueron obtenidas sin inyección de contraste endovenoso y visualizadas en ventana de pulmón (anchura de la ventana, 1500 UH; nivel de la ventana, -600 UH), utilizando un algoritmo de reconstrucción de alta resolución.

Las tomografías computarizadas fueron interpretadas de forma ciega por dos radiólogos (EC y XG) con experiencia en la interpretación de la TACAR. Las discrepancias en las lecturas se resolvieron por consenso. La presencia de bronquiectasias se basó en los siguientes criterios: bronquio que no se estrecha distalmente con un diámetro interno de 110% o mayor que el de la arteria pulmonar adyacente, o bronquios visibles en la porción periférica (1cm) de la superficie pleural, mediastínica o costal (95). La extensión de las bronquiectasias se evaluó en cada lóbulo pulmonar; la llingula se consideró como un lóbulo independiente. La existencia de pequeñas bronquiectasias aisladas en un segmento de un lóbulo pulmonar no fue considerada patológica, ya que pueden aparecer en un porcentaje significativo de la población sana (96). Se utilizó el sistema de clasificación propuesto por Smith y colaboradores (97); la ausencia de bronquiectasia se clasificó como 0, las bronquiectasias presentes en menos del 25% de los bronquios como 1, en el 25-49% de los bronquios como 2, en el 50 a 74 % como 3, y en el 75% o más como 4. La puntuación total osciló entre un valor mínimo de 0 puntos correspondiente a la ausencia de bronquiectasias, y un valor máximo de 24 puntos que indicaban la afectación de todos los lóbulos pulmonares. Los pacientes con una puntuación ≤ 1 se consideraron como normales.

5.6. Variables del estudio

En resumen, se recogieron las siguientes variables:

- a) Descriptivas: edad, IMC, sexo
- b) Clínicas: tabaquismo, ingesta de alcohol, comorbilidades, exacerbaciones ocurridas en el año previo a la inclusión en el estudio, hospitalización durante los 3 meses previos a la exacerbación, antibióticos previos, antibióticos administrados durante el episodio actual (clase antibiótica, días de tratamiento, dosis), corticoesteroides en el año previo (tandas administradas y dosis acumulada) y gravedad de la exacerbación. En caso de hospitalización: días de estancia, antibióticos administrados, necesidad de ventilación mecánica y morbimortalidad.
- c) Función pulmonar (en fase de estabilidad clínica): espirometría forzada, gasometría arterial.
- d) Radiología (en fase de estabilidad clínica): TAC torácico de alta resolución.
- e) Analítica de sangre (en exacerbación): hemograma, función renal, electrolitos, proteína C-reactiva
- f) Microbiología: Cultivo de esputo cuantitativo, sensibilidad antibiótica, RT-PCR frente a virus influenza, parainfluenza, rinovirus, adenovirus, VRS y coronavirus.

5.7. Análisis estadístico

Estudio 1: Se realizó el análisis estadístico basándose en un modelo de *Ecuaciones de Estimación Generalizadas* (GEE) con una estructura de correlación intercambiable en el mismo paciente y errores estándar robustos para dar cuenta de los pacientes individuales con múltiples exacerbaciones. El modelo de regresión logística GEE se utilizó para analizar los factores asociados con el ingreso en el hospital. En el modelo se incluyeron todas las covariables relacionadas con los pacientes que se consideraron a priori clínicamente relevantes y las que tenían un valor de $p < 0,1$. Se examinaron las correlaciones entre pares de predictores para garantizar la ausencia de multicolinealidad en el modelo. Odds ratio (OR) y sus intervalos (IC) se calcularon con una confianza del 95%. Para todos los análisis GEE, se llevó a cabo en primer lugar un análisis univariante.

Estudio 2: Los resultados para las variables categóricas se expresaron como frecuencias absolutas y relativas, y las variables continuas se expresaron como media y desviación estándar (DE). Se compararon los grupos de PA (pacientes con algún aislamiento de *P. aeruginosa*) y no PA (pacientes sin aislamiento de *P. aeruginosa*) para evaluar los factores asociados con el aislamiento de *P. aeruginosa*, mediante la prueba de chi-cuadrado con corrección de continuidad para las variables categóricas. Las variables cuantitativas se analizaron mediante la prueba t de Student o las pruebas no paramétricas correspondientes cuando fue necesario.

El análisis multivariante mediante regresión logística paso a paso se realizó con el aislamiento de *P. aeruginosa* como variable dependiente. Las variables que mostraron una asociación en el análisis univariante ($p < 0,10$) se incluyeron en el modelo como covariables. La posibilidad de multicolinealidad se evaluó por medio de factor de inflación de varianza (VIF); teniendo en cuenta que valores por debajo de 2,5 en cada uno de covarianza descartaron colinealidad en el modelo. Los resultados se expresaron como odds ratios crudas y ajustadas (OR) con intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales, considerándose significación estadística cuando el valor de la p fue $\leq 0,05$.

6. RESULTADOS

Se incluyeron 118 enfermos con criterios espirométricos de EPOC grave y con una media de seguimiento de 1003 ± 306 días. La población de estudio fue predominantemente masculina, con una edad media de 69 ± 8 años, y clasificada como GOLD IV en más de la mitad de los casos. Las características clínicas de los pacientes al inicio del estudio se muestran en la Tabla 1.

Se obtuvieron un total de 466 muestras de esputo durante el seguimiento, de las cuales 386 correspondían a exacerbaciones que cumplían 2 o más criterios de Anthonisen y 80 se obtuvieron en fase de estabilidad clínica.

Tabla 1: Características clínicas de los 118 pacientes con EPOC grave

| Pacientes | 118 |
|-----------------------------------|-------------|
| Seguimiento (días), m (DE) | 1003 ± 306 |
| Edad (años), m (DE) | 69,5 ± 8,2 |
| Tabaquismo activo, n (%) | 13 (11) |
| Paquetes-año, m (DE) | 63,3 ± 31,9 |
| Enolismo >80 g/l, n (%) | 3 (2,5) |
| Vacunación antigripal, n (%) | 105 (89) |
| Vacunación antineumocócica n (%) | 57 (48,3) |
| IMC (Kgr/m ²) | 27,5 ± 4,6 |
| FEV1 pos-PBD (L), m (DE) | 0,97 ± 0,3 |
| FEV1 pos-PBD (% predicho), m (DE) | 34 ± 11 |
| GOLD IV, n (%) | 71 (60) |
| Puntuación BODE , m (DE) | 5,1 ± 1,6 |
| Hipercapnia basal, n (%) | 49 (41,5) |
| Oxigenoterapia crónica, n (%) | 50 (42,4) |
| Indice Charlson, m (SD) | 4,13 ± 1,5 |
| Bronquiectasias n (%) | 56 (47,5) |

Datos expresados como media ± DE o valor absoluto y porcentaje (n %).

Hipercapnia definida como PaCO₂ > 5.9 KPa.

Abreviaciones: Pos-PBD = posbroncodilatador.

6.1. Resultados del Estudio 1

Las 386 exacerbaciones analizadas correspondieron a 44 pacientes con una única exacerbación, a 24 con dos exacerbaciones y a 50 con tres o más exacerbaciones. Seis de estos episodios se excluyeron del análisis final debido al tratamiento con corticosteroides y/o antibióticos en los cinco días previos a la exacerbación. De los 380 episodios restantes, 227 (60%) se trataron de forma ambulatoria con antibióticos orales y/o corticoides (96,5% y 59% respectivamente), mientras que 153 episodios (40%) fueron considerados graves y requirieron ingreso hospitalario.

De un total de 380 muestras de esputo recogidas, los análisis microbiológicos completos fueron posibles en 265 exacerbaciones, al disponer de muestras válidas para el análisis según los criterios de Murray-Washington y de material suficiente para realizar RT-PCR (fig 1). Las bacterias patógenas se cultivaron a partir de 167/265 (63%) de los episodios, siendo *H. influenzae* (n = 66), *S. pneumoniae* (n = 28), *M. catarrhalis* (n = 28) y *P. aeruginosa* (n = 28) las especies más frecuentemente recuperadas. En 96/265 muestras (36%) se detectaron virus; rinovirus fue el más común (n = 56), seguido de parainfluenzae (n = 17), virus de la gripe (n = 9), coronavirus (n = 7), VRS (n = 5) y adenovirus (n = 2). Los virus fueron identificados en 45 de las 98 muestras con cultivos negativos para bacterias (45,9%) y en 51 de las 167 exacerbaciones con cultivos positivos para bacterias (30,5%), siendo considerados como coinfecciones. En estos episodios, las relaciones entre el tipo de bacterias y virus detectados no mostró significación estadística (p = 0,9). La distribución estacional de los virus demostró una mayor prevalencia de infecciones por virus en los períodos de otoño e invierno. Los rinovirus estuvieron presentes en todas las épocas del año, mientras que los virus parainfluenza, influenza y VRS fueron predominantemente aislados en otoño o invierno (figura 2).

Figura 1: Flujograma de las muestras de esputo

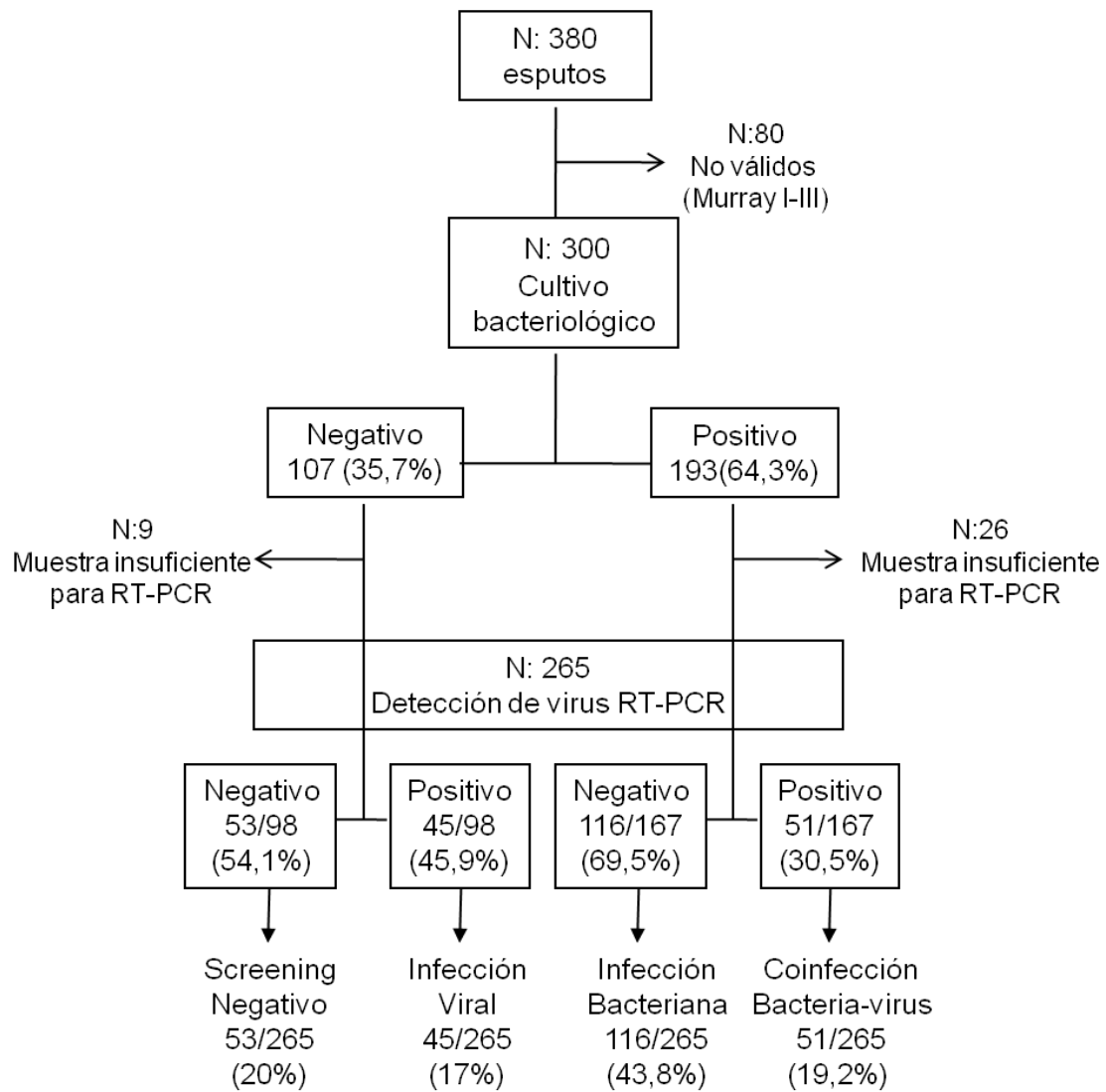
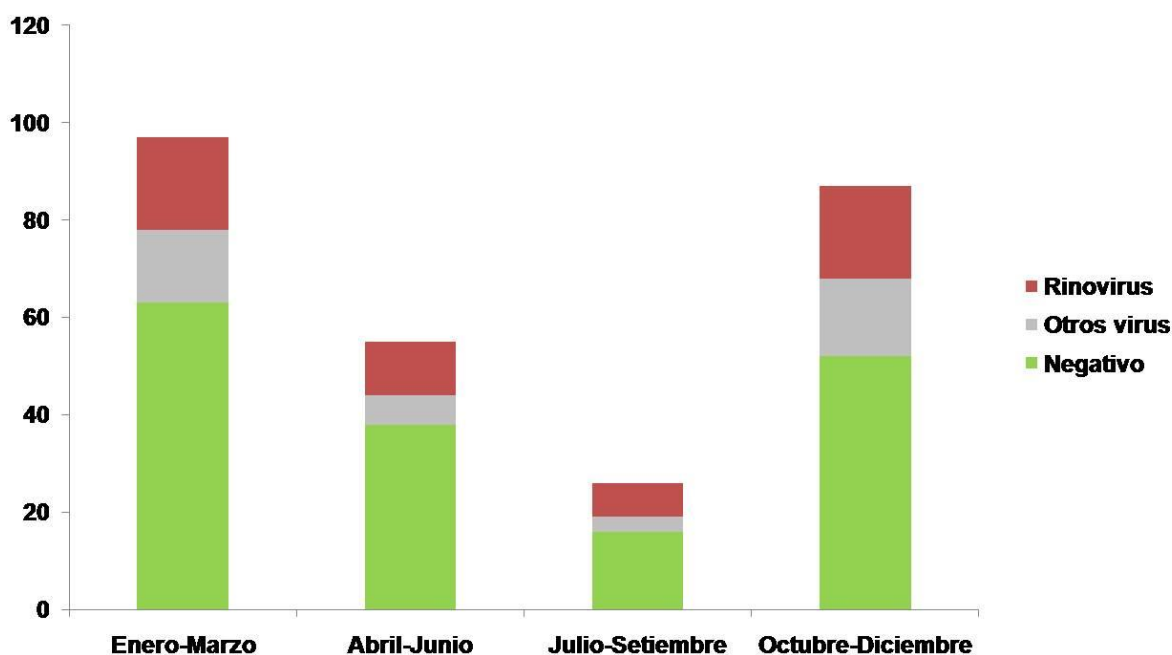


Figura 2: Patrón estacional de detección de virus en los episodio de exacerbación de la EPOC (265 episodios analizados)



6.1.1. Niveles de proteína C reactiva y etiología de las exacerbaciones

La mediana de los niveles de proteína C reactiva, a partir de los 265 episodios con los análisis microbiológicos completos, fue mayor en los casos con cultivos positivos para bacterias (58,3 mg/L, 21,0 a 128,2 RIC) que en los episodios de etiología vírica (37,3 mg/L, 18,6 a 79,1 RIC) y que en los casos negativos para cualquier microorganismo (36,4 mg/L, RIC 10,8 a 93,7) ($p < 0,014$). En las infecciones bacterianas, la proteína C reactiva alcanzó los niveles más altos en las exacerbaciones por *S. pneumoniae* (74,1 mg/L, 42,0 a 220,7 RIC) y *H. influenzae* (74,5 mg/L, 23,9 a 167,9 RIC) en comparación con los episodios relacionados con *P. aeruginosa* (45,2 mg/L, 11,1 a 70,1 RIC) o en las infecciones debidas exclusivamente a virus (37,3 mg/L, 18,6 a 79,1 RIC) (Tabla 2). La proteína C reactiva no se relacionó con la carga bacteriana, a excepción de los aislamientos de *S. pneumoniae*, en los que sí se observó una correlación significativa (fig 3). Los episodios debidos a *S. pneumoniae* también refirieron

fiebre (n = 15, 56%) y necesitaron ingreso hospitalario (n = 17, 60,7%) con más frecuencia que los episodios relacionados con otros microorganismos (p = 0,061 y p = 0,002, respectivamente). Los síntomas de vías respiratorias superiores referidos por los pacientes fueron similares en todos los grupos (Tabla 2).

Figura 3: Relación entre carga bacteriana y valores de proteína C reactiva

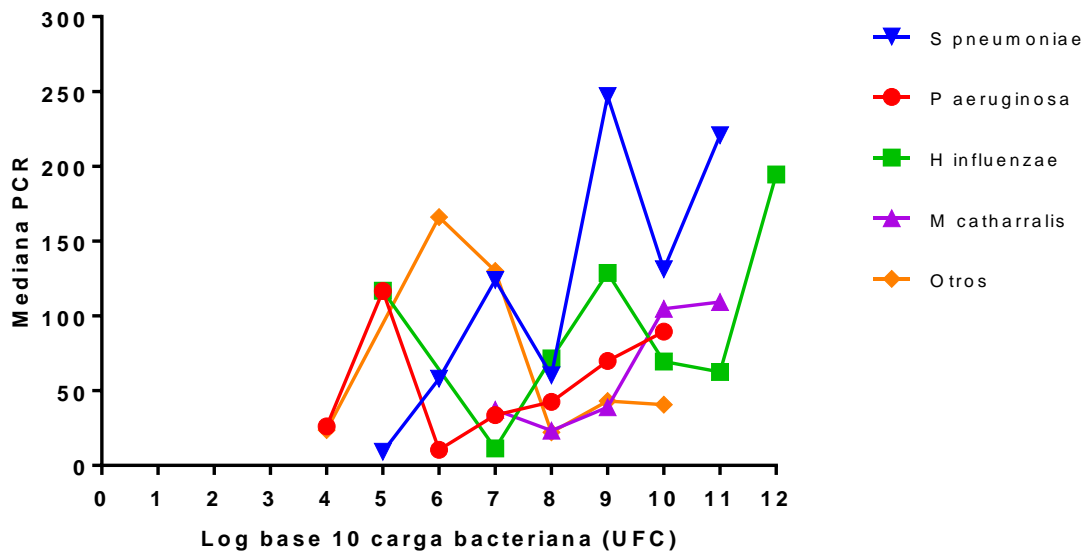


Tabla 2: Características clínicas y biomarcadores de cada microorganismo (N=265)*

| | HI N=66 | SP N=28 | MC N=28 | PS N=28 | Otros N=17 | Negativo N=53 | Virus N=45 | P |
|------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| Fiebre (%) + | 40 | 56 | 36 | 11,5 | 33,3 | 41,7 | 34,9 | 0,061 |
| SVA (%) # | 26,2 | 17,9 | 28,6 | 5,6 | 6,0 | 18,4 | 25,6 | 0,315 |
| Leucocitos (RIQ) | 10480 (8560- 12970) | 11500 (9670- 14740) | 9420 (7862- 9420) | 8985 (7927- 10365) | 9250 (6740- 13250) | 10435 (8487- 11427) | 9585 (7230- 11355) | 0,039 |
| PCR mg/L (RIQ) | 74,50 (23,90- 167,90) | 74,10 (42,0- 220,7) | 38,10 (20,60- 95,40) | 45,20 (11,10- 70,10) | 51,90 (23,60- 166,0) | 36,40 (10,80- 93,70) | 37,30 (18,60- 79,10) | 0,026 |
| Hospitalización (%) | 47 | 60,7 | 21,4 | 57 | 41,1 | 22,6 | 37,8 | 0,002 |

*Cuando se aislaron más de 2 bacterias se analizó aquella con más carga.

+ Valores perdidos: 1 en grupo HI, 1 en SP, 3 en MC, 2 en PS, 2 en Otros, 5 Negativo y 2 en virus

Valores perdidos: 1 en HI, 4 en Negativo y 2 en virus

Abreviaturas: HI: *H. influenza*, SP: *S.pneumoniae*, MC: *M. catarrhalis*, PS: *P aeruginosa*. SVA: Síntomas vía aérea alta.

6.1.2. Niveles de proteína C reactiva y gravedad de la exacerbación

En las 380 exacerbaciones se encontraron diferencias significativas en los niveles de proteína C reactiva entre los episodios atendidos ambulatoriamente (37,3 mg/L, 12,8- 82,7 RIC) y los que precisaron hospitalización (67,4 mg/L, 27- 189 RIC). Otros marcadores de gravedad de la exacerbación tales como frecuencia respiratoria (FR), Sat O₂, PaO₂ y PaCO₂ también se asociaron con la necesidad de ingreso hospitalario (Tabla 3). El aumento de la proteína C reactiva se asoció significativamente con el aumento de FR, de leucocitos y con la disminución de la Sat O₂ (rho = 0,143; p = 0,012, rho = 0,270; p <0,01 y rho

= -0,185; p <0,01, respectivamente). En el modelo GEE para evaluar la influencia de la respuesta inflamatoria en la gravedad de la exacerbación, la proteína C reactiva fue un factor predictor de gravedad, junto con la oxigenoterapia crónica y la hipercapnia basal. Tras ajustar por las variables clínicas y las comorbilidades, tanto la hipercapnia basal como la proteína C reactiva se mantuvieron en el modelo, asociándose los valores de proteína C reactiva por encima de 100 mg/L con un riesgo cuatro veces mayor de ingreso hospitalario (Tabla 4).

Tabla 3: Marcadores de gravedad de la exacerbación (N=380)

| | Ambulatorio | Hospitalización | p* |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|
| Episodios | 227 | 153 | |
| PCR (mg/L) (RIQ) | 37,3 (12,8-82,7) | 67,4 (27,0-189,0) | <0,0001 |
| Leucocitos (RIQ) | 9900(7860-11460) | 10030(8500-14002) | 0,001 |
| FR (RIQ) | 24 (20-28) | 26 (24-30) | 0,002 |
| SaO2 (RIQ) | 94 (92-95) | 89 (85-92) | <0,0001 |
| PaO2 (KPa) RIQ+ | 7,9 (7,3-8,6) | 7,0 (6,2-7,6) | 0,002 |
| PaCO2 (KPa) RIQ+ | 5,7 (5,2-6,6) | 6,2 (5,4-7,5) | 0,001 |
| PH (RIQ)+ | 7,42 (7,40-7,44) | 7,41 (7,39-7,44) | 0,443 |

* Análisis univariante con GEE

+ Únicamente en 197 episodios

Datos expresados como mediana (rango intercuartil)

Tabla 4: Análisis de los factores asociados al ingreso hospitalario. Resultados del análisis univariante y multivariante mediante GEE

| | OR (IC 95%) | p | OR (IC 95%) | p |
|-------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| GOLD IV | 1,28 (0,75-2,18) | 0,36 | ----- | ----- |
| Charlson | 1,15 (0,95-1,40) | 0,14 | 1,12 (0,95-1,32) | 0,15 |
| Bronquiectasias | 1,39 (0,78-2,47) | 0,26 | ----- | ----- |
| BODE | 1,13 (0,93-1,37) | 0,21 | ----- | ----- |
| OCD | 1,89 (1,08-3,32) | 0,02 | 1,14 (0,61-2,13) | 0,67 |
| Hipercapnia basal | 2,69 (1,56-4,64) | <0,0001 | 2,70 (1,46-4,9) | 0,01 |
| PCR (mg/L)* | | | | |
| <18 | 1 | | 1 | |
| 19-40 | 1,74 (0,91-3,33) | 0,09 | 1,64 (0,85-3,15) | 0,13 |
| 41-100 | 2,56 (1,25-5,24) | 0,01 | 2,21 (1,05-4,68) | 0,03 |
| >100 | 4,44 (2,25-8,78) | <0,0001 | 4,23 (2,12-8,44) | <0,0001 |

* Mediana y cuartiles

6.2. Resultados del Estudio 2

6.2.1. Prevalencia y factores de riesgo para la presencia de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa se aisló en las muestras respiratorias de 41/118 pacientes (34,7%) que fueron incluidos en el grupo de PA. En 5 de ellos, se documentaron aislamientos en el año previo a la inclusión sin posteriores aislamientos durante el período de seguimiento; en 22 se observaron cepas de *P. aeruginosa* antes y durante el período de estudio, y en los 14 pacientes restantes, este MPP se recuperó únicamente durante el seguimiento. La comparación de grupos (PA versus no PA) no mostró diferencias significativas en la edad, historia de tabaquismo, volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1), índice de masa corporal, puntuación BODE, comorbilidades, tasa de vacunación antigripal, tasa de vacunación

antineumocócica y uso de oxigenoterapia domiciliaria. Los pacientes del grupo PA sufrieron significativamente más exacerbaciones de la EPOC, presentaron tasas de prescripción de antibióticos y corticosteroides más elevadas y estancias hospitalarias más prolongadas que el grupo no-PA (Tabla 5). Se detectaron bronquiectasias en 56 pacientes (47%), con una puntuación media de $4,2 \pm 2,5$ cuando estaban presentes. En 29/56 pacientes (51,8%) las bronquiectasias se localizaron sólo en los lóbulos inferiores y en 12/56 participantes (21,4%) se identificaron en más de cuatro lóbulos. Los scores de bronquiectasias fueron significativamente mayores en el grupo PA que en el grupo no-PA (3 vs 1,6, $p = 0,02$). La mortalidad también fue significativamente mayor en el grupo PA que en el grupo no-PA (27% vs 8%, $p = 0,005$) (Tabla 5). Para la identificación de los factores de riesgo para el aislamiento de *P. aeruginosa* en pacientes con EPOC grave, las bronquiectasias se clasificaron en tres grupos según su extensión: Categoría 1: No se detectaron bronquiectasias; Categoría 2: bronquiectasias con score entre 2 y 5 y Categoría 3: score mayor de 5. La categoría 1 se utilizó como categoría de referencia. Cuarenta y cinco pacientes (38%) tuvieron una puntuación entre 2 y 5 y en 11 pacientes (9%) la extensión de las bronquiectasias sumó puntuaciones superiores a 5.

El análisis multivariante demostró que la extensión de las bronquiectasias (OR 9,8; IC 95%: 1,7 a 54,8) y el número de ciclos de tratamiento antibiótico (OR 1,7; IC 95%: 1,1 a 2,5) se asociaron de forma independiente con un mayor riesgo de aislamiento de *P. aeruginosa* en las secreciones bronquiales (Tabla 6).

Tabla 5: Características clínicas de 118 pacientes con EPOC grave, con y sin aislamiento de *P. aeruginosa*

| | Total cohorta | Grupo PA | Grupo no PA | P |
|------------------------------------|------------------|----------------|---------------|--------|
| Sujetos, (%) | 118 | 41 (34,7) | 77 (65,3) | ... |
| Seguimiento (días), m (DE) | 1003 ± 306 | 1036,9 ± 347,5 | 984,9 ± 282,3 | 0,41 |
| Edad (años), m (DE) | 69,5 ± 8,2 | 70,3 ± 7,7 | 69 ± 8,5 | 0,42 |
| Tabaquismo activo (%) | 13 (11) | 2 (4,9) | 11 (14,3) | 0,21 |
| Paquetes-año, m (DE) | 63,3 ± 31,9 | 69,4 ± 36,3 | 60 ± 28,9 | 0,15 |
| Enolismo >80 g/l, n (%) | 3 (2,5) | 1 (2,4) | 2 (2,6) | 1 |
| Vacunación antigripal, n (%) | 105 (89) | 38 (92,7) | 67 (87) | 0,53 |
| Vacunación antineumocócica n (%) | 57 (48,3) | 23 (56,1) | 34 (44,2) | 0,21 |
| IMC (Kgr/m ²) | 27,5 ± 4,6 | 26,5 ± 4 | 28,1 ± 4,9 | 0,17 |
| FEV1 pos-PBD, (L), m (DE) | 0,97 ± 0,3 | 0,91 ± 0,28 | 1,0 ± 0,31 | 0,13 |
| FEV1 pos-PBD, (% predicho), m (DE) | 34 ± 11 | 34 ± 13 | 34,3 ± 10 | 0,82 |
| GOLD IV, n (%) | 71 (60) | 27 (66) | 44 (57) | 0,35 |
| Puntuación BODE , m (DE) | 5,1 ± 1,6 | 5,3 ± 1,5 | 5 ± 1,6 | 0,38 |
| Oxigenoterapia crónica, n (%) | 50 (42,4) | 21 (51,2) | 29 (37,7) | 0,15 |
| Charlson, m (DE) | 4,13 ± 1,5 | 4,29 ± 1,5 | 4,04 ± 1,5 | 0,39 |
| Puntuación bronquiectasias, m (DE) | 2,1 ± 2,6 | 3 ± 3,5 | 1,6 ± 1,8 | 0,02 |
| Exacerbaciones seguimiento, m (DE) | 3,19 ± 2,9 | 4,4 ± 4 | 2,5 ± 2 | 0,008 |
| Exacerbaciones/año, m (DE) | 2,19 ± 2 | 3 ± 2,7 | 1,7 ± 1,4 | 0,006 |
| Tandas antibióticas* | 8,9 ± 7,5 | 12,5 ± 9,2 | 7,01 ± 5,7 | <0,001 |
| Tandas antibióticas/año | 3,3 ± 2,5 | 4,7 ± 2,9 | 2,6 ± 1,8 | <0,001 |
| Tandas corticoides* | 6,3 ± 5,8 | 8 ± 6,3 | 5,5 ± 5,4 | 0,02 |
| Tandas corticoides/año | 2,30 ± 1,8 | 2,9 ± 2 | 1,9 ± 1,6 | 0,004 |
| Días ingreso hospitalario* | 29,4 ± 37,9 | 43,8 ± 43,9 | 21,3 ± 31,9 | 0,005 |
| Mortalidad, n (%) | 17 (14,4) | 11 (27) | 6 (8) | 0,005 |

Datos expresados en media ± DE o valor absoluto y porcentaje (n %). Grupo PA= Grupo con aislamientos de *P. aeruginosa* ; Grupo No PA= Nunca aislamientos de *P. aeruginosa* ; pos-PBD= posbroncodilator. * año previo incluido.

Tabla 6: Resultados del análisis multivariante de los factores asociados al aislamiento de *P. aeruginosa*

| Factor | OR | IC 95% | p |
|---------------------------------|------------|-------------------|--------------|
| Score bronquiectasias (>5) | 9,8 | 1,7 - 54,8 | 0,009 |
| Prescripciones antibióticos/año | 1.7 | 1,1 – 2,5 | 0,008 |
| Días de estancia hospitalaria | 1 | 0,9 - 1 | 0,3 |
| Tandas corticoides/año | 0,7 | 0,5 – 1,2 | 0,2 |

6.2.2. Colonización crónica por *P. aeruginosa*

Cinco de los 41 pacientes del grupo PA (12,2%) cumplieron los criterios de colonización crónica por *P. aeruginosa*, sin observarse relación entre esta situación clínica y la extensión de las bronquiectasias. Tres de los cinco pacientes colonizados crónicamente (60%) no mostraron bronquiectasias en la TACAR; como tampoco 15 de los 23 pacientes que tenían aislamientos individuales de *P. aeruginosa* (65%) ($p = 0,75$). La observación del morfotipo mucoide, sin embargo, se asoció significativamente con un score de bronquiectasias mayor de 5 ($p = 0,004$), y se encontró este morfotipo en 4/5 enfermos con score por encima de 5.

6.2.3. Caracterización microbiológica de las cepas de *P. aeruginosa*

Se recuperaron 92 cultivos positivos para *P. aeruginosa* de 41 pacientes, con 78 aislamientos válidos para el genotipado, correspondientes a 31 pacientes. Se identificaron 36 pulsotipos a partir de estos 78 aislamientos, específicos para cada enfermo, excepto en un caso de un pulsotipo compartido por dos pacientes. En la figura 4 se muestra el esquema general del grupo PA con genotipado de *P. aeruginosa*, y en la figura 5 se muestra el dendograma de patrones de PFGE para las 78 cepas de *P. aeruginosa* genotipadas. Trece de los 31 pacientes (41,9%) presentaron un único aislamiento de *P. aeruginosa*. Entre los restantes 18 pacientes con aislamientos repetidos de *P. aeruginosa*, 12 pacientes mostraron la misma clona durante el seguimiento, cumpliendo 5 de ellos los criterios establecidos de colonización crónica (5/41:12%). La evaluación del morfotipo mucoide en las muestras genotipadas demostró este morfotipo en 11 aislamientos de cinco pacientes diferentes (números 1, 25, 28,

30, y 36, en las Tablas 7 y 8) con tres clones (P16, P26 y P4) que adoptan diferentes morfotipos a lo largo del tiempo (tablas 7 y 8). Treinta y siete de las 78 cepas de *P. aeruginosa* mostraron sensibilidad a todos los antibióticos testados (47,4%), 20/78 fueron resistentes frente a uno o dos grupos de antibióticos (25,6%), mientras que las 21/78 restantes cumplieron criterios de multirresistencia (26,9%). El perfil de resistencia a los antibióticos de las 78 cepas de *P. aeruginosa* genotipadas se muestra en la Tabla 9. Las cepas multirresistentes fueron aisladas en 5 pacientes (números 1, 13, 19, 25 y 29, en las Tablas 7 y 8), tres de ellos colonizados crónicamente. Estos tres pacientes albergaron 19 de las 21 cepas multirresistentes observadas (90%). Las clonas de todos estos pacientes mostraron fluctuaciones de la sensibilidad frente a los antimicrobianos a lo largo del tiempo.

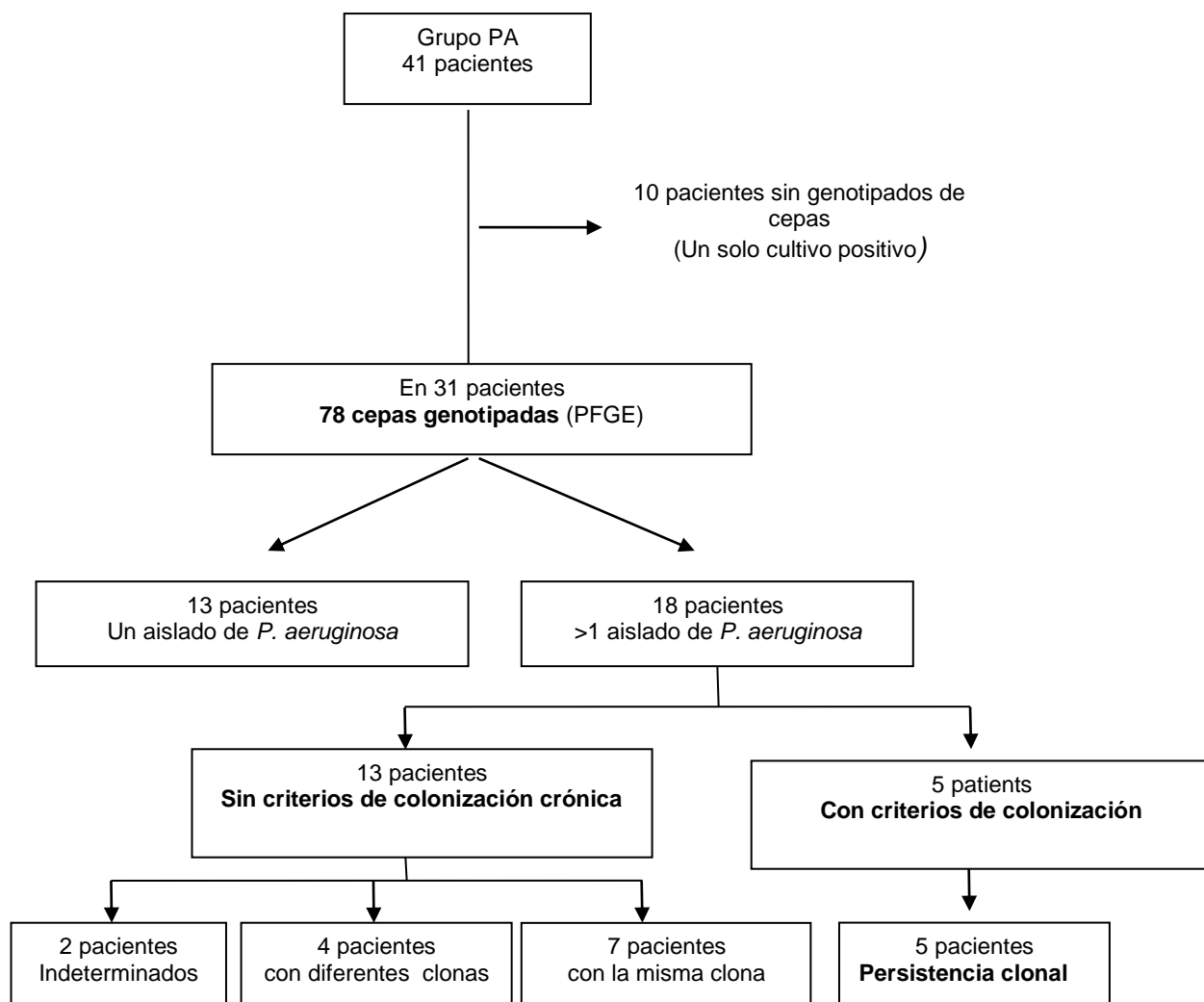


Figura 4: Flujograma de la distribución de los pacientes con aislados de *P. aeruginosa* genotipados. El grupo indeterminado corresponde a enfermos con tres aislamientos pero un único aislado genotipado

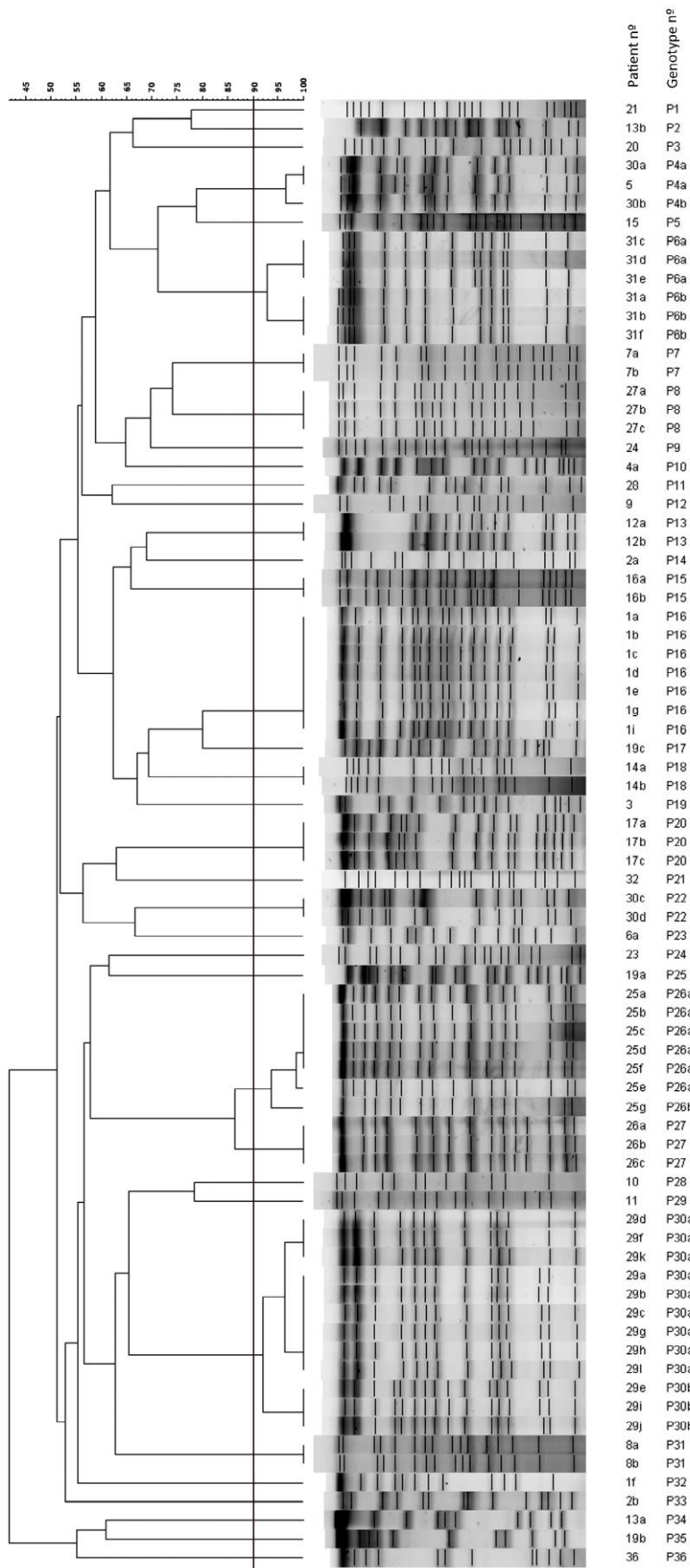


Figura 5: Dendrograma de los patrones de PGFE de los 78 aislados de *P. aeruginosa*. La línea negra denota el punto de corte del 90%, a partir del cual los aislados tienen el mismo pulstotipo

Tabla 7: Características de los aislados de *P. aeruginosa* genotipados en pacientes con criterios de colonización crónica

| Aislados | enfermo | PFGE | Genotipo | AEPOC | Día | aislamiento | Morfotipo |
|----------|---------|-------------------|----------|-----------|-----|--------------------------------------|-----------|
| 1e | | P16 | No | 24/Mar/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 1f | | P32 | No | 24/Mar/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 1a | | P16 | Sí | 10/Ene/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 1b | | P16 | No | 16/Feb/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 1g | | P16 | Sí | 21/Mar/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 1i | | P16 | Sí | 21/Mar/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid | |
| 1c | | P16 | Sí | 23/Abr/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid | |
| 1d | | P16 | Sí | 31/May/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 25a | | P26 ^{a1} | Sí | 18/Ago/05 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid | |
| 25b | | P26 ^{a1} | No | 3/Nov/05 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid | |
| 25c | | P26 ^{a1} | Sí | 5/Dic/05 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 25d | | P26 ^{a1} | No | 9/Ene/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid | |
| 25e | | P26 ^{a2} | No | 17/Mar/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid | |
| 25f | | P26 ^{a1} | Sí | 11/Ene/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid | |
| 25g | | P26 ^b | Sí | 23/Abr/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid | |
| 26a | | P27 | Sí | 10/Oct/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 26b | | P27 | Sí | 12/Nov/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 26c | | P27 | No | 14/Dic/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29a | | P30 ^{a2} | Sí | 2/Mar/05 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29b | | P30 ^{a2} | No | 17/Jun/05 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29c | | P30 ^{a2} | Sí | 9/Nov/05 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29k | | P30 ^{a1} | Sí | 12/Dic/05 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29l | | P30 ^{a2} | Sí | 12/Dic/05 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29d | | P30 ^{a1} | No | 23/Ene/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29e | | P30b | No | 3/Jul/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29f | | P30 ^{a1} | No | 18/Sep/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29g | | P30 ^{a2} | No | 7/Nov/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29h | | P30 ^{a2} | No | 27/Dic/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29i | | P30 ^b | No | 12/Sep/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 29j | | P30 ^b | No | 17/Dic/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 31a | | P06 ^b | Sí | 9/Oct/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 31b | | P06 ^b | No | 21/Nov/06 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 31c | | P06 ^a | Sí | 22/Mar/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 31d | | P06 ^a | No | 27/Abr/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 31e | | P06 ^a | Sí | 4/Sep/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| 31f | | P06 ^b | No | 17/Oct/07 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |

Los pacientes están identificados por números y los diferentes aislados por letras. Los pulsotipos están identificados por números y el superíndice indica los mismos pulsotipos con un coeficiente de Dice entre el 90-99%.

Tabla 8: Características de los aislados genotipados de *P. aeruginosa* en enfermos sin criterios de colonización crónica por *P. aeruginosa*

| Aislados enfermos | PFGE Genotipo | AEPOC | Día aislamiento | Morfotipo |
|--------------------------|----------------------|--------------|------------------------|---|
| 2a | P14 | Sí | 17/Oct/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 2b | P33 | Sí | 15/Feb/08 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 3 | P19 | Sí | 17/Oct/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 4 | P10 | Sí | 2/Jun/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 5 | P04 ^a | Sí | 22/Mar/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 6 | P23 | Sí | 4/Jul/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 7a | P07 | Sí | 1/Dic/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 7b | P07 | No | 12/Nov/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 8a | P31 | No | 8/Sep/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 8b | P31 | No | 12/Dic/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 9 | P12 | Sí | 14/Dic/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 10 | P28 | Sí | 10/Ago/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 11 | P29 | Sí | 5/Oct/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 12a | P13 | Sí | 7/Apr/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 12b | P13 | No | 18/Oct/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 13a | P34 | Sí | 30/May/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 13b | P02 | Sí | 11/Oct/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 14a | P18 | Sí | 28/Ene/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 14b | P18 | Sí | 28/Jul/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 15 | P05 | Sí | 2/Feb/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 16a | P15 | Sí | 23/Nov/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 16b | P15 | Sí | 3/Ene/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 17a | P20 | Sí | 3/Nov/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 17b | P20 | Sí | 22/Dic/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 17c | P20 | Sí | 8/Jun/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 19a | P25 | Sí | 19/Dic/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 19b | P35 | No | 12/Jun/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 19c | P17 | Sí | 3/Mar/08 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 20 | P03 | Sí | 28/Nov/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 21 | P01 | Sí | 4/Feb/08 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 23 | P24 | Sí | 6/Mar/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 24 | P09 | Sí | 30/Jun/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 27a | P08 | Sí | 20/Mar/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 27b | P08 | No | 12/Abr/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 27c | P08 | No | 25/Jul/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 28 | P11 | Sí | 11/Oct/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoïd |
| 30a | P04 ^a | Sí | 10/Ene/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 30b | P04 ^b | No | 21/Feb/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoïd |
| 30c | P22 | No | 19/Dic/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 30d | P22 | Sí | 8/Feb/08 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 36 | P36 | Sí | 23/May/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoïd |
| 32 | P21 | Sí | 10/Nov/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

Los pacientes están identificados por números y los diferentes aislados por letras. Los pulsotipos están identificados por números y el superíndice indica los mismos pulsotipos con un coeficiente de Dice entre el 90-99%.

Tabla 9: Sensibilidad frente antibióticos de las 78 aislamientos de *P. aeruginosa*

| Grupo antibiótico | Antibiótico | Nº cepas sensibles (%) |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Quinolonas | | 39 (50) |
| | Ciprofloxacino | 37 (47,4) |
| | Levofloxacino | 39 (50) |
| Aminoglicósidos | | 63 (80,8) |
| | Tobramicina | 54 (69,2) |
| | Amikacina | 61 (78,2) |
| | Gentamicina | 37 (47,4) |
| Penicilinas | | 63 (80,8) |
| | Ticarcilina | 58 (74,4) |
| | Piperacilina tazobactam | 63 (80,8) |
| Cefalosporinas | | 58 (74,4) |
| | Ceftazidima | 58 (74,4) |
| | Cefepime | 51 (65,4) |
| Carbapenems | | 62 (79,5) |
| | Imipenem | 50 (64,1) |
| | Meropenem | 62 (79,5) |
| Polimixinas | Colistina | 76 (97,4) |
| Monobactams | Aztreonam | 59 (75,6) |

7. DISCUSIÓN

7.1. Estudio 1: Etiología y respuesta inflamatoria en las exacerbaciones de los enfermos con EPOC grave

En una cohorte bien caracterizada de pacientes con EPOC grave con exacerbaciones tipo I-II de Anthonisen, la inflamación sistémica, medida por proteína C reactiva, se asoció con la etiología bacteriana (principalmente *S. pneumoniae* o *H. influenzae*), y con la carga bacteriana cuando *S. pneumoniae* era el agente causal. La proteína C reactiva fue, además, un buen predictor de la gravedad: las exacerbaciones con niveles de proteína C reactiva por encima de 100 mg/L se asociaron con una probabilidad 4 veces mayor de hospitalización respecto a aquéllas con valores inferiores; asimismo este riesgo fue directamente proporcional, es decir aumentaba con el incremento de la respuesta inflamatoria. La hipercapnia basal fue también un predictor adicional de la probabilidad de hospitalización en nuestra cohorte. Por tanto, la proteína C reactiva aparece como un buen marcador biológico para la identificación de las exacerbaciones graves en los pacientes con EPOC con enfermedad avanzada, principalmente relacionado con infecciones bacterianas debidas a *S. pneumoniae* y *H. influenzae*.

La prevalencia de la infección en los pacientes ambulatorios con EPOC grave en nuestro estudio fue del 80%, con cifras de más del 60% para bacterias y casi el 40% para virus, la mitad de ellos como coinfecciones con bacterias patógenas. Estos datos son similares a los obtenidos en otros estudios centrados en pacientes que requieren hospitalización debido a la gravedad del episodio, (53,98) lo que sugiere que este patrón etiológico caracteriza las exacerbaciones en la EPOC grave. *H. influenzae* fue la bacteria más frecuentemente aislada en el presente estudio y fue la causa de una cuarta parte de las exacerbaciones, seguido por *S. pneumoniae*, *M. catharralis* y *P. aeruginosa*.

En consonancia con otros estudios, los rinovirus fueron los más detectados en nuestro estudio, en el 30% de los casos como una coinfección con bacteria patógena (36,53). Los niveles de proteína C reactiva en sangre periférica estuvieron claramente relacionados con la etiología de la exacerbación en la

población estudiada, observándose las cifras más altas en las exacerbaciones por *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, con una relación estadísticamente significativa entre la carga bacteriana y los niveles plasmáticos de este marcador inflamatorio en el caso de *S. pneumoniae*. El impacto sistémico de este MPP ha sido evaluado en pacientes con neumonía, relacionándose con la gravedad y el pronóstico (99,100) y está determinado por una interacción huésped-patógeno favorecida por polisacárido C de la pared celular neumocócica (101). El poder inflamatorio de *H. influenzae* en el árbol bronquial es bien conocido, y se ha relacionado con la carga microbiana (102), pero el efecto sistémico de este MPP ha sido estudiado sólo marginalmente. Nuestros resultados confirman que las infecciones bronquiales debidas a *H. influenzae* tienen un claro efecto sistémico en los pacientes con EPOC grave, equivalente al efecto producido por *S. pneumoniae*. Este hallazgo es clínicamente significativo, ya que *H. influenzae* es la causa más frecuente de exacerbación en estos pacientes, representando las infecciones por *H. influenzae* y *S. pneumoniae* casi la mitad de los episodios. Por el contrario, la detección de virus se asoció con niveles más bajos de PCR y menor gravedad. Nuestros resultados están en desacuerdo con los de estudios previos que han observado niveles elevados de PCR en suero en pacientes con exacerbaciones inducidas por virus (36,55) Las diferencias son probablemente debidas a que los estudios anteriores se han centrado en las exacerbaciones graves que requieren hospitalización, perdiendo episodios de menor gravedad, que pueden estar parcialmente relacionados con los virus y que probablemente cursan con niveles menores de proteína C reactiva, los cuales sí han sido evaluados en nuestro estudio.

Desafortunadamente, y como ya se estableció en investigaciones previas (103) los niveles de proteína C reactiva fueron incapaces de predecir la etiología de la exacerbación, debido a la superposición de niveles entre los diferentes microorganismos.

En nuestro estudio, los niveles de proteína C reactiva se relacionaron claramente con la necesidad de hospitalización: valores de proteína C reactiva por encima de 100 mg/L, se asociaron a una probabilidad de ingreso hospitalario 4 veces superior con respecto a aquellos episodios con valores inferiores. Estas cifras elevadas de proteína C reactiva se relacionaron

principalmente con infecciones bacterianas producidas por *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Esta relación no dependió de las covariables evaluadas, y apoya la importancia de este marcador inflamatorio en la evaluación de las exacerbaciones en enfermos con EPOC grave; sin embargo, en estudios previos, no resultó útil en la predicción de la gravedad (51,68). Nuestro estudio sugiere similitudes con la neumonía en lo que se refiere a la importancia de la proteína C reactiva para la manejo de estas entidades. De hecho, un punto corte por encima de 100 mg/L se ha asociado con resultados adversos (100) y demostrado una capacidad predictiva para la selección de pacientes con neumonía que requieren ingreso en UCI (104). Valores similares de proteína C reactiva han demostrado también poder predictivo en la selección de pacientes con EPOC agudizada que requiere ingreso en la UCI, aunque el número de pacientes estudiados (n = 64) no fue suficiente como para extraer conclusiones generalizables (105).

Nuestro estudio también ha subrayado la importancia de la hipercapnia basal como un marcador de la gravedad de los episodios agudos, en consonancia con estudios anteriores que han demostrado asociación de la hipercapnia con la disminución de la supervivencia (106). La presencia de hipercapnia basal duplicó el riesgo de ingreso hospitalario y parece razonable pensar que esta alteración es un marcador de un subgrupo de pacientes más graves y frágiles, al menos en nuestra cohorte. En dos estudios con pacientes afectados de EPOC exacerbada (62,63) la adición de los parámetros de gases en sangre arterial (presión parcial de oxígeno y de dióxido de carbono y pH) en el momento de la exacerbación no mejoró la predicción de la mortalidad durante la hospitalización, pero se demostró estrechamente relacionada con la necesidad de ingreso. Sin embargo, en estos estudios no se aportaron los valores gasométricos basales.

7.1.1. Limitaciones del Estudio 1

El presente estudio presenta algunas limitaciones relacionadas con la selección de los pacientes. Los participantes procedían de una población de EPOC grave controlada regularmente en un hospital de día de neumología, y nuestros resultados podrían no ser extrapolables a la población de EPOC en su

conjunto. El número de episodios registrados en los diferentes pacientes también varió ampliamente. A pesar de que se utilizó un enfoque estadístico basado en GEE para afrontar este problema, no podemos descartar una posible sobrerrepresentación de un subgrupo particular de pacientes que pueden ser más susceptibles a microorganismos específicos. Por último, las infecciones por virus respiratorios comunes como metapneumovirus y bocavirus no fueron analizados en nuestro estudio, por lo que la verdadera prevalencia de la infección por virus podría estar ligeramente subestimada.

7.2. Estudio 2: Factores de riesgo de infección por *P. aeruginosa* en la EPOC grave

Nuestro estudio muestra una alta prevalencia de aislamientos de *P. aeruginosa* en una cohorte de pacientes con EPOC grave. La extensión de las bronquiectasias y el uso recurrente de antibióticos fueron los principales factores de riesgo para la recuperación de este MPP en muestras respiratorias. La mayoría de los pacientes en el grupo PA tuvieron aislamientos únicos de *P. aeruginosa*, pero hasta el 12% de los pacientes cumplieron criterios de colonización crónica, aunque esta situación clínica no se relacionó con la presencia de bronquiectasias. Además, en este subgrupo de enfermos se observó persistencia clonal de la *P. aeruginosa*, tal y como está descrito en pacientes con fibrosis quística.

Prevalencia y factores de riesgo para la presencia de *P. aeruginosa*

Se aisló *P. aeruginosa* en esputo en casi el 40% de los pacientes con EPOC grave en nuestra serie, la mitad de los cuales presentaron bronquiectasias. Estas cifras son similares a las observadas en estudios previos en pacientes con enfermedad avanzada, tal y como mostraron Murphy et al (107) y Renom et al (108), que informó del aislamiento de *P. aeruginosa* en más de un tercio de las muestras de esputo obtenidas de pacientes EPOC.

En nuestro estudio se observa una fuerte asociación entre la extensión de las bronquiectasias y el aislamiento de *P. aeruginosa*. La comorbilidad de las bronquiectasias ha quedado claramente establecida en diversos estudios realizados en EPOC grave (95,109, 110], pero la asociación entre las bronquiectasias y el aislamiento de *P. aeruginosa* se ha abordado sólo marginalmente en los estudios anteriores. García-Vidal et al (76) analizaron 188 pacientes con EPOC moderada a grave ingresados en el hospital por agudización de su EPOC y estudiados con TACAR, identificando bronquiectasias en el 52% de ellos, pero sin encontrar relaciones significativas entre las bronquiectasias y el aislamiento de *P. aeruginosa*. En una población similar de 201 pacientes con EPOC, Martínez-García et al (110) observaron que el aislamiento de *P. aeruginosa* fue significativamente más frecuente en los pacientes con bronquiectasias (13% frente a 4,7%). Nuestro estudio demuestra que, en pacientes con EPOC avanzada, la relación entre las bronquiectasias y el aislamiento de *P. aeruginosa* está claramente definida y asociada con la extensión de la anormalidad bronquial. Además, entre los otros factores de riesgo evaluados para la presencia de *P. aeruginosa* en nuestro estudio, únicamente el número de tratamientos antibióticos previos se asoció independientemente con la recuperación de este MPP, tras tener en cuenta las covariables en el análisis multivariante. Esta conclusión está de acuerdo con estudios previos que han encontrado una relación entre los tratamientos antibióticos y el posterior aislamiento de *P. aeruginosa* en muestras de esputo (76,77). La falta de una relación en el análisis multivariante entre los ingresos hospitalarios previos y la recuperación de *P. aeruginosa* en nuestro estudio puede atribuirse a las diferencias en el diseño del mismo, debido a que se centró en los pacientes que asisten regularmente a un hospital de día, o al mayor peso de los tratamientos antibióticos recurrentes como predictor. Aunque el presente estudio no fue diseñado para evaluar la mortalidad, se observó una mayor tasa de mortalidad durante el seguimiento en el grupo PA, lo que está en consonancia con lo referido por otros autores (78, 108).

Caracterización de *P.aeruginosa* en la colonización crónica

Cerca del 50% de los pacientes con EPOC (grupo PA) tuvieron aislamientos repetidos de *P. aeruginosa*, cumpliendo criterios de colonización crónica por

este MPP más del 10% de los casos. Del mismo modo, Martínez-García et al (110) observó colonización crónica por *P. aeruginosa* en 11/201 pacientes con EPOC moderada a grave. La caracterización molecular de cepas de *P. aeruginosa* en nuestra cohorte de enfermos demostró la persistencia de un mismo pulsotipo en dos tercios de ellos y en todos los pacientes colonizados crónicamente.

Son pocos los estudios que han evaluado la colonización crónica por *P. aeruginosa* en pacientes con EPOC y aquellos en los que se ha estudiado, han mostrado resultados contradictorios. Los estudios que evaluaron cepas de *P. aeruginosa* por PFGE en muestras respiratorias de enfermos con EPOC mostraron un patrón de infección crónica similar a la fibrosis quística (111,112) en un limitado número. Por el contrario, en un estudio de seguimiento a 10 años que incluyó 126 pacientes con EPOC, Murphy et al (107) observaron dos patrones distintos de aislamiento de *P. aeruginosa*: un patrón más frecuente de presencia a corto plazo seguida por la eliminación de la cepa, en hasta la mitad de los episodios, y un patrón de persistencia de la misma cepa, en una cuarta parte de los episodios. Rakhimova et al (113) genotipó cepas de *P. aeruginosa* de la misma cohorte y los comparó con cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística que presentaban infección crónica por *P. aeruginosa* (n = 128), llegando a la conclusión de que la infección esporádica o intermitente por *P. aeruginosa* fue el más hallazgo frecuente en las secreciones bronquiales de pacientes con EPOC, que presentaron un recambio clonal frecuente, un patrón que se diferencia del de portador crónico de clonas de *P. aeruginosa*, típico de enfermos con fibrosis quística. Nuestros resultados confirman que, aunque el patrón más frecuente en la EPOC grave es un aislamiento autolimitado de *P. aeruginosa*, más del diez por ciento de los pacientes graves muestran colonización crónica por *P. aeruginosa*, con el patrón de persistencia clonal, en estrecha similitud con la fibrosis quística. No se pudo relacionar, sin embargo, la colonización crónica con la extensión de las bronquiectasias. Factores distintos de las bronquiectasias que no fueron evaluados en nuestro estudio, tales como los factores de virulencia o la producción de *biofilm*, podrían explicar la capacidad de *P. aeruginosa* para colonizar a estos pacientes (111). Más de la mitad de los aislamientos procedentes de pacientes colonizados crónicamente por el mismo pulsotipo mostraron resistencia a múltiples

fármacos y presentaron fluctuaciones en su susceptibilidad antimicrobiana a lo largo del tiempo. Esta variabilidad en el antibiograma de *P. aeruginosa* se ha descrito previamente (114) en la fibrosis quística, sugiriendo una población policlonal que puede no estar bien representada en los cultivos de esputo. Del mismo modo, algunos clones de *P. aeruginosa* en nuestro estudio adoptaron ambos fenotipos, mucoide y no mucoide durante el seguimiento, un hallazgo que también se ha descrito en la fibrosis quística (115). Por último, aunque el morfotipo mucoide se considera un marcador de colonización crónica (116), en nuestro estudio se relacionó especialmente con los scores elevados de bronquiectasias.

7.2.1. Limitaciones del Estudio 2

Los pacientes con EPOC de una población seleccionada participaron en este estudio y los resultados no se pueden extrapolar a la población de EPOC en su conjunto. Sólo se incluyeron pacientes con EPOC grave y exacerbaciones frecuentes, tratadas de forma ambulatoria u hospitalaria a través de nuestro hospital de día: los resultados en estos pacientes pueden no ser aplicables a pacientes que requieren ingresos hospitalarios repetidos en las exacerbaciones o a pacientes con una enfermedad menos grave.

Además, los análisis microbiológicos se llevaron a cabo sólo en muestras de esputo espontáneo, y no se obtuvo información sobre la flora bronquial de pacientes o de episodios sin producción de esputo. Estas limitaciones, sin embargo, no reducen la importancia de los resultados obtenidos, teniendo en cuenta que la producción de esputo espontáneo es la situación más común en estos pacientes durante las exacerbaciones.

8. CONCLUSIONES

8.1. Conclusiones del Estudio 1

En conclusión, este estudio demuestra una alta prevalencia de la infección bacteriana, debida principalmente a *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* y *P. aeruginosa*, en las exacerbaciones que aparecen en pacientes ambulatorios con EPOC grave. La prevalencia de las infecciones virales fue significativamente menor. La inflamación sistémica evaluada a través de los niveles en sangre de proteína C reactiva fue mayor en las infecciones bacterianas, sobre todo en las causadas por *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, y las cifras elevadas de este biomarcador inflamatorio se relacionaron con la gravedad del episodio. Los resultados sugieren que los niveles en sangre de PCR pueden desempeñar un papel en el manejo de las exacerbaciones que aparecen en estos pacientes graves.

8.2. Conclusiones del Estudio 2

En resumen, nuestro estudio demuestra una alta prevalencia de aislamientos de *P. aeruginosa* en pacientes con EPOC grave. La extensión de las bronquiectasias y el número de tandas de tratamiento antibiótico recibidas fueron los principales factores de riesgo asociados con el aislamiento de este MPP. Asimismo, más de una décima parte de los pacientes con EPOC cumplieron criterios de colonización crónica por *P. aeruginosa* y mostraron persistencia clonal de este MPP, independientemente de la extensión de las bronquiectasias.

Estos resultados tienen implicaciones clínicas para el manejo de los pacientes con EPOC grave y exacerbaciones frecuentes, los cuales pueden requerir la realización de una TACAR para la identificación de las bronquiectasias y de cultivos de esputo repetidos para la valoración de la colonización bronquial crónica por este MPP. La *P. aeruginosa* debe ser considerado como un agente causal frecuente en estos pacientes, especialmente en aquellos con un score alto de bronquiectasias y que reciben tratamiento antibiótico frecuentemente. De acuerdo con nuestros datos, sería recomendable un seguimiento cercano a aquellos pacientes en los que se aísla *P. aeruginosa*, para una identificación temprana de la colonización crónica, una situación que requeriría un enfoque similar al aplicado en la fibrosis quística.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): 2013. Available from: <http://www.goldcopd.org/>.
2. Miravittles M, Soriano JB, Garcia-Rio R, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sanchez G, *et al.* Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax*. 2009; 64:863–8.
3. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, *et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380:2163-96.
4. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Patrones de mortalidad en España, 2013. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2016.
5. Registro de Altas de los Hospitales Generales del Sistema Nacional de Salud. Disponible en: <http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/cmbd.htm>.
6. Solanes Garcia, P. Casan Clara. Causas de muerte y predicción de mortalidad en la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2010; 46(7):343–346.
7. Lokke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follows up study of the general population. *Thorax*. 2006; 61:935-9.
8. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, *et al.* The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004; 350:1005-12.
9. Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, *et al.* Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. Spanish COPD Guidelines (GesEPOC): pharmacological treatment of stable COPD. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery. *Arch Bronconeumol*. 2012; 48(7):247-57
10. Divo M, Cote C, de Torres JP, Casanova C, Marin JM, Pinto-Plata V, *et al.* Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186(2):155-61.

11. Soriano JB, Sauleda J. Chapter 12. How the COPD patient should be assessed for co-morbidities. En: Rennard I, et al, eds. Clinical management of chronic obstructive lung disease. 2nd ed. Boston: Informa Healthcare; 2007
12. 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; 106:196–204.
13. Rodriguez-Roisin, R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest.* 2000; 117:398S-401S.
14. Hurst J. R., J. Vestbo, A. Anzueto, N. Locantore, H. Mullerova, R. Tal-Singer, B. *et al.* Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N.Engl.J.Med.* 2010. 363:1128-1138.
15. Hurst JR, Donaldson GC, Quint JK, Goldring JJ, Baghai-Ravary R, Wedzicha JA. Temporal clustering of exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179(5):369-74.
16. Aaron SD, Donaldson GC, Whitmore GA, Hurst JR, Ramsay T, Wedzicha JA. Time course and pattern of COPD exacerbation onset. *Thorax.* 2012; 67(3):238-43.
17. Hurst JR, Wedzicha JA. Management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: a state of the art review. *BMC Med.* 2009; 7; 7:40.
18. Beeh KM, Glaab T, Stowasser S, Schmidt H, Fabbri LM, Rabe KF, *et al.* Characterisation of exacerbation risk and exacerbator phenotypes in the POET-COPD trial. *Respir Res.* 2013 Oct 29; 14:116.
19. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157(5):1418-22.
20. Jones PW, Lamarca R, Chuecos F, Singh D, Agustí A, Bateman ED, *et al.* Characterisation and impact of reported and unreported exacerbations: results from ATTAIN. *Eur Respir J.* 2014; 44(5):1156-65.
21. Miravittles M, Anzueto A. Role of infection in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2015; 21(3):278-83.
22. Soler, N., C. Agusti, J. Angrill, D. I. B. Puig, A. Torres. Bronchoscopic validation of the significance of sputum purulence in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2007; 62:29-35.

23. Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(1):108-16.
24. Matkovic Z, Miravittles M. Chronic bronchial infection in COPD. Is there an infective phenotype? *Respir Med*. 2013; 107(1):10-22.
25. Marin A, Garcia-Aymerich J, Sauleda J, Belda J, Millares L, García-Núñez M, *et al*. Effect of bronchial colonisation on airway and systemic inflammation in stable COPD. *COPD*. 2012; 9(2):121-30.
26. Rosell A, Monsó E, Soler N, Torres F, Angrill J, Rise G, *et al*. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med*. 2005; 165:891–7.
27. Garcha DS, Thurston SJ, Patel AR, Mackay AJ, Goldring JJ, Donaldson GC, *et al*. Changes in prevalence and load of airway bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD. *Thorax*. 2012; 67:1075–80.
28. Miravittles M, Marín A, Monsó E, Vilà S, De La Roza C, Hervás R, *et al*. Colour of sputum is a marker for bacterial colonisation in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2010; 11:58.
29. Man SF, Connett JE, Anthonisen NR, Wise RA, Tashkin DP, Sin DD. C-reactive protein and mortality in mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2006; 61(10):849-53.
30. Barker BL, Haldar K, Patel H, Pavord ID, Barer MR, Brightling CE, *et al*. Association between pathogens detected using quantitative polymerase chain reaction with airway inflammation in COPD at stable state and exacerbations. *Chest*. 2015 Jan; 147(1):46-55.
31. Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2002; 347(7):465-71.
32. Murphy TF, Brauer AL, Eschberger K, Lobbins P, Grove L, Cai X, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177(8):853-60..
33. Murphy TF, Brauer AL, Sethi S, Kilian M, Cai X, Lesse AJ. *Haemophilus haemolyticus*: a human respiratory tract commensal to be distinguished from *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis*. 2007; 195:81–89

34. Molyneaux P, Mallia P, Cox MJ, Footitt J, Willis-Owen S, Homola D, *et al.* Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 188:1224–31.
35. Diederer BM, van der Valk PD, Kluytmans JA, Peeters MF, Hendrix R. The role of atypical respiratory pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2007; 30(2):240-4.
36. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, *et al.* Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164(9):1618-23.
37. Matsuse T, Hayashi S, Kuwano K, Keunecke H, Jefferies WA, Hogg JC. Latent adenoviral infection in the pathogenesis of chronic airways obstruction. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146(1):177-84.
38. Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, Elliott WM, Liu C, Wang XD, Hayashi S, *et al.* Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 26(1):52-7.
39. Wilkinson TM, Donaldson GC, Johnston SL, Openshaw PJ, Wedzicha JA. Respiratory syncytial virus, airway inflammation, and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173(8):871-6.
40. Beasley V, Joshi PV, Singanayagam A, Molyneaux PL, Johnston SL, Mallia P. Lung microbiology and exacerbations in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2012; 7:555-69.
41. Mohan A, Chandra S, Agarwal D, Guleria R, Broor S, Gaur B, *et al.* Prevalence of viral infection detected by PCR and RT-PCR in patients with acute exacerbation of COPD: a systematic review. *Respirology.* 2010; 15:536–542.
42. Wilkinson TM, Hurst JR, Perera WR, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA. Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD. *Chest.* 2006; 129: 317–324.
43. Mallia P, Message SD, Gielen V, Contoli M, Gray K, Kebabze T, *et al.* Experimental rhinovirus infection as a human model of chronic obstructive

- pulmonary disease exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(6):734-42.
44. Siobhán N. George, Davinder S. Garcha, Alexander J. Mackay, Anant R.C. Patel, Richa Singh, Raymond J. Sapsford, *et al.* Human rhinovirus infection during naturally occurring COPD exacerbations. *Eur Respir J.* 2014; 44: 87–96.
45. Seemungal TA, Harper-Owen R, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Detection of rhinovirus in induced sputum at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2000; 16(4):677-83.
46. Rohde G, Borg I, Wiethage A, Kauth M, Jerzinowski S, An Duong Dinh T, *et al.* Inflammatory response in acute viral exacerbations of COPD. *Infection.* 2008; 36(5):427-33.
47. Quint JK, Donaldson GC, Goldring JJ, Baghai-Ravary R, Hurst JR, Wedzicha JA. Serum IP-10 as a biomarker of human rhinovirus infection at exacerbation of COPD. *Chest.* 2010; 137:812–822.
48. Gompertz S, O'Brien C, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 2001; 17:1112–1119.
49. Stockley RA, Hill AT, Hill SL, Campbell EJ. Bronchial inflammation: its relationship to colonizing microbial load and alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Chest.* 2000; 117:291S–293S.
50. Sethi S, Muscarella K, Evans N, Klingman KL, Grant BJ, Murphy TF. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest.* 2000; 118:1557–1565.
51. Hurst, J. R., G. C. Donaldson, W. R. Perera, T. M. Wilkinson, J. A. Bilello, G. W. Hagan, *et al.* Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J Respir.Crit Care Med.* 2006; 174:867-874.
52. Pant S, Walters EH, Griffiths A, Wood-Baker R, Johns DP, Reid DW. Airway inflammation and anti-protease defences rapidly improve during treatment of an acute exacerbation of COPD. *Respirology.* 2009; 14:495–503.
53. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, *et al.* Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173(10):1114-21.

54. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, *et al.* Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184(6):662-71.
55. Clark TW, Medina MJ, Batham S, Curran MD, Parmar S, Nicholson KG. C-reactive protein level and microbial aetiology in patients hospitalised with acute exacerbation of COPD. *Eur Respir J.* 2015; 45(1):76-86.
56. Menéndez R, Sahuquillo-Arce JM, Reyes S, Martínez R, Polverino E, Cillóniz C, *et al.* Cytokine activation patterns and biomarkers are influenced by microorganisms in community-acquired pneumonia. *Chest.* 2012; 141(6):1537-45.
57. Dev, D., E. Wallace, R. Sankaran, J. Cunniffe, J. R. Govan, C. G. Wathen, *et al.* Value of C-reactive protein measurements in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir.Med.* 1998; 92:664-667.
58. Lacombe A, Prat C, Andreo F, Lores L, Ruiz-Manzano J, Ausina V, *et al.* Value of procalcitonin, C-reactive protein, and neopterin in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2011; 6:157-69.
59. Brill SE, Wedzicha JA. Oxygen therapy in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2014; 7;9:1241-52.
60. Celli BR, MacNee W: Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004, 23:932-9464.
61. Franciosi LG, Page CP, Celli BR, Cazzola M, Walker MJ, Danhof M, *et al.* Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2006; 10; 7:74.
62. Vidal S, González N, Barrio I, Rivas-Ruiz F, Baré M, Blasco JA, *et al.* Predictors of hospital admission in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013; 17(12):1632-7.
63. Quintana JM, Esteban C, Unzurrunzaga A, Garcia-Gutierrez S, Gonzalez N, Barrio I, *et a.* Predictive score for mortality in patients with COPD exacerbations attending hospital emergency departments. *BMC Med.* 2014; 23; 12:66.

64. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:89–95.
65. Agustí A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, et al; Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One.* 2012; 7(5):e37483.
66. Thomsen M, Ingebrigtsen TS, Marott JL, Dahl M, Lange P, Vestbo J, et al. Inflammatory biomarkers and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA.* 2013; 309(22):2353-61.
67. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Leuppi J, Miedinger D, Bingisser R, et al. Copeptin, C-reactive protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbation of COPD. *Chest.* 2007; 31(4):1058-67.
68. Bozinovski, S., A. Hutchinson, M. Thompson, L. Macgregor, J. Black, E. Giannakis, et al. Serum amyloid a is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177:269-278.
69. Puhan MA, Vollenweider D, Latshang T, Steurer J, Steurer-Stey C. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: when are antibiotics indicated? A systematic review. *Respir Res.* 2007;8:30.
70. Vollenweider DJ, Jarrett H, Steurer-Stey CA, Garcia-Aymerich J, Puhan MA. Antibiotics for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; 12;12:CD010257.
71. Wilson R, Anzueto A, Miravittles M, Arvis P, Alder J, Haverstock D, et al. Moxifloxacin versus amoxicillin/clavulanic acid in outpatient acute exacerbations of COPD: MAESTRAL results. *Eur Respir J.* 2012 ; 40(1):17-27.
72. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Garau J, Huchon G, Ieven M, et al. Taskforce of the European Respiratory Society and European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections--full version. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17 Suppl 6:E1-59.
73. Miravittles M, Espinosa C, Fernández-Laso E, Martos JA, Maldonado JA, Gallego M, and study group of bacterial infection in COPD. Relationship

between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. *Chest* 1999; **116**: 40-46.

74. Eller J, Ede A, Schaberg T, Niederman M, Mauch H, Lode H. Infective exacerbation of chronic bronchitis. Relation between bacteriologic etiology and lung function. *Chest* 1998; **113**: 1542-1548.

75. Monsó E, Garcia-Aymerich J, Soler N, Farrero E, Felez MA, Antó JM, Torres A; EFRAM Investigators. Bacterial infection in exacerbated COPD with changes in sputum characteristics. *Epidemiol Infect.* 2003 Aug; **131**(1):799-804

76. García-Vidal C, Almagro P, Romaní V, Rodríguez-Carballeira M, Cuchi E, Canales L, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalised for COPD exacerbation: a prospective study. *Eur Respir J* 2009; **34**: 1072-1078.

77. Lode H, Allewelt M, Balk S, De Roux A, Mauch H, Niederman M, *et al.* A prediction model for bacterial etiology in acute exacerbations of COPD. *Infection.* 2007; 35(3):143-9.

78. Almagro P, Salvadó M, Garcia-Vidal C, Rodríguez-Carballeira M, Cuchi E, Torres J, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and mortality after hospital admission for chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration.* 2012; 84(1):36-43.

79. Montero M, Domínguez M, Orozco-Levi M, Salvadó M, Knobel H. Mortality of COPD patients infected with multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a case and control study. *Infection.* 2009; 37(1):16-9.

80. Daniels JM, de Graaff CS, Vlaspoolder F, Snijders D, Jansen HM, Boersma WG. Sputum colour reported by patients is not a reliable marker of the presence of bacteria in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(6):583-8.

81. Stockley, R. A., C. O'Brien, A. Pye, and S. L. Hill. Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD. *Chest.* 2000; 117:1638-1645.

82. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin Chem.* 2003; 49(8):1258-71.

83. Daniels JM, Schoorl M, Snijders D, Knol DL, Lutter R, Jansen HM, *et al.* Procalcitonin vs C-reactive protein as predictive markers of response to antibiotic therapy in acute exacerbations of COPD. *Chest.* 2010; 138(5):1108-15.

84. Soler N, Esperatti M, Ewig S, Huerta A, Agustí C, Torres A. Sputum purulence-guided antibiotic use in hospitalised patients with exacerbations of COPD. *Eur Respir J*. 2012 ;40(6):1344-53.
85. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, Gencay MM, Huber PR, Tamm M, *et al*. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet*. 2004 ;363:600-7.
86. Stolz D., M. Christ-Crain, R. Bingisser, J. Leuppi, D. Miedinger, C. Muller, *et al*. Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy. *Chest*. 2007; 131 (1):9-19.
87. Murray PR, Washington JA: Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc*. 1975; 50(6):339–344.
88. Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. 5th Edn. Washington, American Society of Microbiology, 1991.
89. Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig de la Bellacasa J, Xaubet A *et al*. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur Respir J*. 1997; 10(5):1137–1144.
90. Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-Breña P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol*. 2004; 72(3):484-95.
91. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards 2004; M100–S114.
92. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, *et al*. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis*. 2009; 62: 372-377.
93. Cantón R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, *et al*. ; Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Sep; 11(9):690-703.

94. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 268-281.
95. Patel IS, Vlahos I, Wilkinson TMA, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wilks M, *et al.* Bronchiectasis, Exacerbation Indices, and Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 400-407.
96. Lynch DA, Newell JD, Tschomper BA, Cink TM, Newman LS, Bethel R. Uncomplicated asthma in adults: comparison of CT appearances of the lungs in asthma and in healthy subjects. *Radiology.* 1993; 188: 829-833.
97. Smith IE, Jurriaans E, Diederich S, Ali N, Shneerson J, Flower CDR. Chronic sputum production: correlation between clinical features and findings on high resolution computed tomographic scanning of the chest. *Thorax.* 1996; 51:914-918.
98. Ko FW, Ip M, Chan PK, Fok JP, Chan MC, Ngai JC, *et al.* A 1-year prospective study of the infectious etiology in patients hospitalized with acute exacerbations of COPD. *Chest.* 2007; 131(1):44-52.
99. Krüger S, Ewig S, Papassotiriou J, Kunde J, Marre R, von Baum H, *et al.* Inflammatory parameters predict etiologic patterns but do not allow for individual prediction of etiology in patients with CAP: results from the German competence network CAPNETZ. *Respir Res.* 2009; 12; 10:65.
100. Chalmers JD, Singanayagam A, Hill AT. C-reactive protein is an independent predictor of severity in community-acquired pneumonia. *Am J Med.* 2008; 121(3):219-25.
101. Peisajovich, A., L. Marnell, C. Mold, and T.W. Du Clos. C reactive protein at the interface between innate immunity and inflammation. *Expert Review of Clinical Immunology.* 2008; 4: 379–390.
102. Marin A, Monsó E, Garcia-Nuñez M, Sauleda J, Noguera A, Pons J, *et al.* Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur Respir J.* 2010; 35(2):295-302.
103. Kherad O, Kaiser L, Bridevaux PO, *et al.* Upper-respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations. *Chest.* 2010; 138(4):896-904.

104. Ramírez P, Ferrer M, Martí V, Reyes S, Martínez R, Menéndez R, *et al.* Inflammatory biomarkers and prediction for intensive care unit admission in severe community-acquired pneumonia. *Crit Care Med.* 2011; 39(10):2211-7.
105. Karadeniz G, Polat G, Senol G, Buyuksirin M. C-reactive protein measurements as a marker of the severity of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Inflammation.* 2013. Aug; 36(4):948-53.
106. Postma DS, Burema J, Gimeno F, May JF, Smit JM, Steenhuis EJ, *et al.* Prognosis in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1979; 119:357–367.
107. Murphy TF, Brauer AL, Eschberger K, Lobbins P, Grove L, Cai X, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 853-860.
108. Renom F, Yáñez A, Garau M, Rubí M, Centeno MJ, Gorriz MT, *et al.* Prognosis of COPD patients requiring frequent hospitalization: Role of airway infection. *Respir Med* 2010; 104: 840-848.
109. Martínez-García MA, Soler-Cataluña JJ, Donat Y, Catalán P, Agramunt M, Ballestín J, *et al.* Factors associated with bronchiectasis in patients with COPD. *Chest.* 2011; 140: 1130-1137.
110. Martínez-García MA, de la Rosa D, Soler-Cataluña JJ, Donat-Sanz Y, Catalán P, Agramunt M, *et al.* Prognostic value of bronchiectasis in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187: 823-831.
111. Martínez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martínez JL. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis.* 2008; 47: 1526-1533.
112. Valderrey AD, Pozuelo MJ, Jiménez PA, Maciá MD, Oliver A, Rotger R. Chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* of patients with obstructive lung disease: cystic fibrosis, bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2010; 68: 20-27.
113. Rakhimova E, Wiehlmann L, Brauer AL, Sethi S, Murphy TF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* population biology in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis.* 2009; 200: 1928-35.
114. Foweraker JE, Loughton CR, Brown DF, Bilton D. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective

exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jun; 55(6): 921-7.

115. Hogardt M, Heesemann J. Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 358:91-118.

116. Novosad SA, Barker AF. Chronic obstructive pulmonary disease and bronchiectasis. *Curr Opin Pulm Med.* 2013; 19(2):133-9.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Pseudomonas aeruginosa isolates in severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization and risk factors

Miguel Gallego^{1,2,3*}, Xavier Pomares¹, Mateu Espasa⁴, Eva Castañer⁵, Mar Solé⁶, David Suárez⁷, Eduard Monsó^{1,2,3†} and Concepción Montón^{1†}

Abstract

Background: Patients with severe chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are at increased risk of infection by *P. aeruginosa*. The specific role of bronchiectasis in both infection and chronic colonization by this microorganism in COPD, however, remains ill defined.

To evaluate the prevalence and risk factors for *P. aeruginosa* recovery from sputum in outpatients with severe COPD, characterizing *P. aeruginosa* isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and focusing on the influence of bronchiectasis on chronic colonization in these patients.

Methods: A case-cohort study of 118 patients with severe COPD attended at a Respiratory Day Unit for an acute infectious exacerbation and followed up over one year. High-resolution CT scans were performed during stability for bronchiectasis assessment and sputum cultures were obtained during exacerbation and stability in all patients. *P. aeruginosa* isolates were genotyped by PFGE. Determinants of the recovery of *P. aeruginosa* in sputum and chronic colonization by this microorganism were assessed by multivariate analysis.

Results: *P. aeruginosa* was isolated from 41 of the 118 patients studied (34.7%). Five of these 41 patients (12.2%) with *P. aeruginosa* recovery fulfilled criteria for chronic colonization. In the multivariate analysis, the extent of bronchiectasis (OR 9.8, 95% CI: 1.7 to 54.8) and the number of antibiotic courses (OR 1.7, 95% CI: 1.1 to 2.5) were independently associated with an increased risk of *P. aeruginosa* isolation. Chronic colonization was unrelated to the presence of bronchiectasis ($p = 0.75$). In patients with chronic colonization the isolates of *P. aeruginosa* retrieved corresponded to the same clones during the follow-up, and most of the multidrug resistant isolates (19/21) were harbored by these patients.

Conclusions: The main risk factors for *P. aeruginosa* isolation in severe COPD were the extent of bronchiectasis and exposure to antibiotics. Over 10% of these patients fulfilled criteria for chronic colonization by *P. aeruginosa* and showed clonal persistence, independently of the presence of bronchiectasis.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease, Bronchiectasis, Chronic colonization, *Pseudomonas aeruginosa*

* Correspondence: mgallego@tauli.cat

†Equal contributors

¹Department of Respiratory Medicine, Hospital de Sabadell, Institut Universitari Parc Taulí-UAB, Sabadell, Spain

²Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Infectious exacerbations are the most important cause of hospital admission and mortality in severe chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [1,2]. Potentially pathogenic microorganisms (PPMs) such as *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and viruses are the leading causative agents of these acute episodes, but *P. aeruginosa* accounts for 5-10% of COPD exacerbations in these patients and has been associated with increased mortality [3].

It is widely accepted that the probability of bacterial infection is higher in exacerbations appearing in severe COPD patients. Two studies [4,5] have shown that individuals with a FEV1 below 50% of the reference level have a six-fold higher risk of suffering exacerbations due to *H. influenzae* and *P. aeruginosa* than patients with mild or moderate COPD. Likewise, *P. aeruginosa* infection in COPD has also been related to risk factors such as previous hospital admissions and use of oral corticosteroids or antibiotics [6-9] but the importance of these individual determinants has not been elucidated. Moreover, the role of other potential factors such as bronchiectasis, as a risk factor of *P. aeruginosa* in chronic infection—a factor associated with severe airflow obstruction in COPD [10], has been addressed only marginally [8]. In the context of COPD exacerbation, the majority of guidelines recommend specific treatment against *P. aeruginosa* in patients reporting hospital admissions and/or recurrent use of antibiotics or corticosteroids [11,12]; but the management of patients with repeated isolates of this PPM is not well established. Recent studies based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and polymerase chain reaction have shown that most clones are cleared over time and that only a minority persist [13]. In some patients a pattern of chronic colonization by *P. aeruginosa* has been reported, closely resembling those seen in cystic fibrosis [14,15]. Unfortunately, the relationship between chronic colonization by *P. aeruginosa*, the pattern of clonal carriage and bronchiectasis has not been evaluated to date.

The objectives of our study were to evaluate the prevalence and risk factors for *P. aeruginosa* isolation in sputum samples from outpatients with severe COPD, characterizing *P. aeruginosa* isolates in these patients with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and focusing on the influence of bronchiectasis and other risk factors, on bronchial colonization in these patients.

Methods

Study subjects

Studied patients were part of a cohort of severe COPD outpatients attending regularly Respiratory Diseases Day Care Unit of Sabadell University hospital for scheduled and exacerbation visits. This cohort included COPD patients with a postbronchodilator FEV1 below 50%

from the reference who reported three or more severe exacerbations in the previous year. Patients in the cohort received education on self-care of the disease and a personal action plan, which included unscheduled visits to the Unit when exacerbation symptoms appear.

Patients with severe COPD attending the Unit for an exacerbation of COPD (ECOPD), defined by the presence of two or three of Anthonisen's criteria [16], were enrolled in this case-cohort study between January 2005 and March 2008, and followed from that episode onwards for a minimum period of one year.

Exclusion criteria: patients previously diagnosed with bronchiectasis in view of symptoms and chest X-rays, patients <40 years of age, patients diagnosed with asthma, cystic fibrosis or active neoplasia, those receiving chronic treatment with oral corticosteroids or immunosuppressive drugs for any reason and those patients under long-term systemic or inhaled antibiotic therapy.

For the purpose of the study, patients were divided into two groups according to the presence of *P. aeruginosa* in sputum samples. Patients with one or more isolates of *P. aeruginosa* from sputum at baseline or during the follow-up, or with *P. aeruginosa* recoveries from sputum samples in the previous year were assigned to the *P. aeruginosa* group (PA group), and patients with no previous recovery of *P. aeruginosa* and who did not present this microorganism from their sputum samples during the follow-up were assigned to the non-*P. aeruginosa* group (non-PA group). Written informed consent was obtained from each subject and ethical permission for the study was obtained from the Sabadell University Hospital Ethics Committee.

COPD clinical evaluation

COPD was defined as a postbronchodilator ratio of FEV₁ to FVC of less than 0.7 according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) criteria in a patient with a smoking habit of more than 10 pack-years [12]. At baseline, smoking history, severity of the disease, BODE index [17], comorbidities (Charlson index) [18], use of long-term home oxygen therapy, short-term treatments with antibiotics and corticosteroids and hospitalizations due to respiratory causes in the previous year were recorded.

All patients underwent the same scheduled clinical controls at the Respiratory Day Care Unit [19] by the same team of pulmonologists and received regular treatment with long-term beta-agonists (LABA), anticholinergics and inhaled corticosteroids (ICS). After the enrolment visit, scheduled visits were recorded together with unscheduled acute ECOPD visits, hospitalizations and mortality due to respiratory causes. When acute symptoms appeared, chest radiography was performed to rule out acute pneumonia and decisions regarding antibiotic treatment and admission were left to the discretion of attending physicians in

accordance with international guidelines [11,12], adjusting the antibiotic prescriptions to the antibiogram. In case of *Pseudomonas aeruginosa* isolation, oral quinolone (ciprofloxacin or levofloxacin) or anti-pseudomonal intravenous therapy was initiated according to the severity of the episode.

Isolation of *P. aeruginosa* in three or more consecutive sputum cultures, taken at least one month apart during a 6-month period, was considered as chronic colonization by this PPM, independently of their recovery from exacerbation or stability periods and assuming the persistence of the microorganism in the periods of stability between exacerbations, [20]. In these patients, chronic treatment with inhaled colistin plus long-term azithromycin was indicated and prescribed from the diagnosis.

Bronchiectasis assessment

CT scans were performed in stability to evaluate bronchiectasis using a Multidetector CT scanner (Sensation 16 Siemens; Erlangen, Germany). High resolution CT (HRCT) images were obtained, during fully suspended inspiration in the supine position from the lung apex to the diaphragm, using a thin-section technique (1-mm collimation at 10-mm intervals) with the following parameters: 120 kVp tube voltage, 250 mA, and 1-second scanning time. The images were obtained without injection of contrast material and viewed in a lung window (window width, 1500 HU; window level, -600 HU), using a high spatial frequency algorithm for image reconstruction.

The CT scans were interpreted for the presence of bronchiectasis by two radiologists experienced (EC and XG) in the interpretation of HRCT and blinded to the patient grouping. Any differences in the reading were resolved by consensus. Presence of bronchiectasis was based on the following criteria: non-tapering bronchus with internal diameter 110% or greater than the adjacent pulmonary artery, or visible bronchi within 1 cm of the costal or mediastinal pleural surface [21]. Bronchiectasis extent was scored for each pulmonary lobe, grading the lingula as a separate lobe. Small bronchiectasis only visible in a single pulmonary segment were not considered, as they may appear in a significant percentage of healthy population [22]. The grading system proposed by Smith and coworkers [23] was used in the study, scoring the absence of bronchiectasis as 0, bronchiectasis in fewer than 25% of bronchi as 1, in 25-49% of bronchi as 2, in 50-74% as 3, and in 75% or more as 4. Total score ranged from a minimum value of 0 points corresponding to absence of bronchiectasis, to a maximum value of 24 points indicating involvement of all pulmonary lobes. Patients with a score ≤ 1 were considered as normal.

Sputum bacteriology

Spontaneous sputum samples were collected in each ECOPD before antibiotic administration. Stability samples

were collected in scheduled visits at least one month after the clinical resolution of any previous acute episode in patients producing spontaneous sputum. Recovered sputum was processed within 60 minutes of collection in all cases, and Murray-Washington criteria were used for the identification and selection of samples representative of bronchial secretions [24]. Sputum samples graded Murray IV-V were cultured for PPMs in selective media according to standard methods [25], and cultures were considered positive when PPMs were recovered.

Briefly, samples were vortexed for 30-60 seconds after homogenization with sputolysin and 10 μ L were cultured using a calibrated loop in blood agar, blood agar with nalidixic acid, chocolate agar and McConkey agar plates. All plates were incubated in a 5% carbon dioxide incubator at 35°C and read at 18 and 48 hours. Gram-negative and Gram-positive bacteria recognized as agents causing respiratory infections, such as *H. influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and Enterobacteriaceae were considered as PPMs [26]. The presence or absence of a mucoid phenotype was recorded for each isolate. Antimicrobial susceptibility testing of *P. aeruginosa* isolates were performed using the microdilution assay to determine the minimum inhibitory concentration according to the procedures of the Clinical and Laboratory Standards Institute [27]. Multidrug resistance (MDR) in *P. aeruginosa* was defined as resistance to three or more antibiotic groups usually active against the PPM, including beta-lactams (penicillins and cephalosporins), carbapenems, quinolones or aminoglycosides, monobactam and polymyxins [28].

P. aeruginosa genotyping

P. aeruginosa isolates were frozen at -80°C and subsequently genotyped. The genetic relatedness of the *P. aeruginosa* isolates in the present study was assessed by pulsed-field electrophoresis (PFGE), essentially following a modification of the method of Durmaz et al. [29]. Genomic DNA was prepared after centrifugation of 1 ml from a 1.5 McFarland solution obtained from fresh cultures grown on blood agar plates. Pellets were resuspended in 120 μ L of suspension buffer (CSB; 100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA) and mixed with an equal volume of molten (55°C) 2% InCert® agarose (Lonza) prepared in CSB with 1% sodium dodecyl sulphate (SDS). The DNA was digested with 30 U of SpeI restriction enzyme (New England Biolabs) and incubated at 37°C for 17 hours. The digested DNA was electrophoresed in a CHEF-DR III system (Bio-Rad) with the following running parameters: 6 V/cm at 14°C with pulse times ranging from 5 to 25 seconds for 20 hours. Gels were stained with SYBR® Safe (Invitrogen) and documented in a ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare). Gel images were analyzed using InfoQuest™ FP software version 4.5 (Bio-Rad, Laboratories).

Cluster analysis was generated using the Dice coefficient, with an unweighted pair-group method that uses arithmetic average (UPGMA) clustering, with a tolerance setting of 1% and optimization of 0.5%. Isolates were defined as the same PFGE clonal type if the Dice coefficient was $\geq 90\%$.

Statistical analysis

The SPSS statistical package version 17.0 (SPSS; Chicago, Illinois) was used for the statistical analysis. Results for categorical variables were expressed as absolute and relative frequencies, and continuous variables were expressed as means and standard deviations (SD). PA and non-PA groups were compared for the assessment of factors associated with *P. aeruginosa* isolation, using the chi-square test with continuity correction for categorical variables. Quantitative variables were analyzed using Student's t-test or the corresponding non-parametrical tests when required.

Multivariate analysis using stepwise logistic regression was performed with PA isolation as dependent variable.

Variables showing a univariate association ($p < 0.10$) were included in the model as covariates. Multicollinearity was evaluated by means of Variance Inflation Factor (VIF); considering that values below 2.5 in each covariate ruled out collinearity in the model. Results were expressed as crude and adjusted odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI). All statistical tests were two-sided, with a p value of 0.05 or less reported as statistically significant.

Results

Population sample

One hundred eighteen severe COPD patients with a mean (SD) follow-up of 1003 (306) days were enrolled over the study period. The study population was predominantly male, with a mean (SD) age of 69 (8) years, and classified as GOLD IV in over half of the cases. Clinical characteristics of participating patients at baseline are shown in Table 1.

A total of 466 sputum samples were obtained at baseline and during the follow-up, both during exacerbations

Table 1 Baseline and clinical characteristics of 118 severe COPD patients attended for COPD exacerbation (ECOPD), with and without *P. aeruginosa* isolation

| | Whole group | PA-group | Non PA-group | P value |
|---------------------------------------|-----------------|--------------------|-------------------|------------------|
| Subjects, (%) | 118 | 41 (34.7) | 77 (65.3) | ... |
| Follow-up (days), m (SD) | 1003 \pm 306 | 1036.9 \pm 347.5 | 984.9 \pm 282.3 | 0.41 |
| Age (years), m (SD) | 69.5 \pm 8.2 | 70.3 \pm 7.7 | 69 \pm 8.5 | 0.42 |
| Current smoking, (%) | 13 (11) | 2 (4.9) | 11 (14.3) | 0.21 |
| Pack-year, m (SD) | 63.3 \pm 31.9 | 69.4 \pm 36.3 | 60 \pm 28.9 | 0.15 |
| Alcohol abuse >80 g/l, n (%) | 3 (2.5) | 1 (2.4) | 2 (2.6) | 1 |
| Influenza vaccination, n (%) | 105 (89) | 38 (92.7) | 67 (87) | 0.53 |
| Pneumococcus vaccination n (%) | 57 (48.3) | 23 (56.1) | 34 (44.2) | 0.21 |
| Body mass index (Kgr/m ²) | 27.5 \pm 4.6 | 26.5 \pm 4 | 28.1 \pm 4.9 | 0.17 |
| FEV1 post-BD, (L), m (SD) | 0.97 \pm 0.3 | 0.91 \pm 0.28 | 1.0 \pm 0.31 | 0.13 |
| FEV1 post-BD, (% predicted), m (SD) | 34 \pm 11 | 34 \pm 13 | 34.3 \pm 10 | 0.82 |
| GOLD stage IV, n (%) | 71 (60) | 27 (66) | 44 (57) | 0.35 |
| BODE score, m (SD) | 5.1 \pm 1.6 | 5.3 \pm 1.5 | 5 \pm 1.6 | 0.38 |
| Home oxygen therapy, n (%) | 50 (42.4) | 21 (51.2) | 29 (37.7) | 0.15 |
| Charlson, m (SD) | 4.13 \pm 1.5 | 4.29 \pm 1.5 | 4.04 \pm 1.5 | 0.39 |
| Bronchiectasis score, m (SD) | 2.1 \pm 2.6 | 3 \pm 3.5 | 1.6 \pm 1.8 | 0.02 |
| ECOPD during follow-up, m (SD) | 3.19 \pm 2.9 | 4.4 \pm 4 | 2.5 \pm 2 | 0.008 |
| ECOPD/year, m (SD) | 2.19 \pm 2 | 3 \pm 2.7 | 1.7 \pm 1.4 | 0.006 |
| Antibiotic prescriptions* | 8.9 \pm 7.5 | 12.5 \pm 9.2 | 7.01 \pm 5.7 | <0.001 |
| Antibiotic prescriptions/year | 3.3 \pm 2.5 | 4.7 \pm 2.9 | 2.6 \pm 1.8 | <0.001 |
| Corticosteroid courses* | 6.3 \pm 5.8 | 8 \pm 6.3 | 5.5 \pm 5.4 | 0.02 |
| Corticosteroid courses/year | 2.30 \pm 1.8 | 2.9 \pm 2 | 1.9 \pm 1.6 | 0.004 |
| Days of hospital stay* | 29.4 \pm 37.9 | 43.8 \pm 43.9 | 21.3 \pm 31.9 | 0.005 |
| Mortality, n (%) | 17 (14.4) | 11 (27) | 6 (8) | 0.005 |

Data are presented as means \pm SD or n (%), unless otherwise stated. PA group = *P. aeruginosa* group; Non PA group = Non *P. aeruginosa* group; ns = not significant; post-BD = post bronchodilator. *prior year included.

(n = 386) and in stability (n = 80). Three hundred and twenty PPMs were isolated from 263 sputum samples and in 92 sputum samples no PPM was recovered. The most frequently isolated bacteria were *H. influenzae* (94 recoveries, 29.3%) *P. aeruginosa* (92, 28.7%) *S. pneumoniae* (51, 15.9%) and *M. catarrhalis* (46, 14.3%).

Prevalence and risk factors for *P. aeruginosa* isolation

P. aeruginosa was recovered once or more from sputum samples in 41 of 118 patients (34.7%) who were included in the PA group. In five of them, isolates were reported during the year before inclusion with posterior negative samples for this PPM during the follow-up period; twenty-two had isolates growing *P. aeruginosa* before and during study period, and in the remaining 14 patients, this PPM was recovered only during follow-up.

Group comparison showed no significant differences in age, smoking history, FEV1, body mass index, BODE score, comorbidities, influenza and pneumococcus vaccination and long-term oxygen therapy use. Patients in the PA group had significantly more COPD exacerbations, higher antibiotic and corticosteroid prescription rates, and longer hospital stays than the non-PA group (Table 1).

Bronchiectasis were found in 56 patients (47%), with a mean score of 4.2 (2.5) when present. In 29 patients (51.8%) bronchiectasis were localized only in lower lobes, and in 12 participants (25.4%) were identified in more than four lobes. Bronchiectasis scores were significantly higher in the PA group than in the non-PA group (3 vs 1.6, p = 0.02). Mortality was also significantly higher in the PA group than in the non-PA group (27% vs 8%, p = 0.005) (Table 1).

For the identification of risk factors for *P. aeruginosa* isolation in severe COPD, bronchiectasis were categorized in three groups according to their extent: 1) No bronchiectasis; 2) bronchiectasis scored 2–5; and 3) bronchiectasis scored over 5, using the first group as reference category. Forty-five patients (38%) had scores between 2 and 5, and 11 patients (9%) had more extensive bronchiectasis with scores higher than 5. Multivariate analysis showed that the extent of bronchiectasis (OR 9.8, 95% CI: 1.7 to 54.8) and the number of courses of antibiotic therapy (OR 1.7, 95% CI: 1.1 to 2.5) were independently associated with an increased risk of *P. aeruginosa* isolation in bronchial secretions (Table 2).

Table 2 Results of multivariate analysis of factors associated with *P. aeruginosa* isolation

| Factor | OR | 95% CI | P value |
|-------------------------------|------------|-------------------|--------------|
| Bronchiectasis score (>5) | 9.8 | 1.7 - 54.8 | 0.009 |
| Antibiotic prescriptions/year | 1.7 | 1.1 - 2.5 | 0.008 |
| Days of hospital stay | 1 | 0.9 - 1 | 0.3 |
| Corticosteroid courses/year | 0.7 | 0.5 - 1.2 | 0.2 |

P. aeruginosa colonization and bronchiectasis

Five of 41 patients (12.2%) fulfilled criteria of chronic colonization by *P. aeruginosa* without a relationship between this clinical situation and the extent of bronchiectasis. Three out of five chronically colonized patients (60%) did not show bronchiectasis on the CT scan; nor did 15 out of 23 patients who had single isolates of *P. aeruginosa* (65%) (p = 0.75). The observation of a mucoid morphotype, however, was significantly associated with a bronchiectasis score over 5 (p = 0.004), and found in four out of five patients with this morphotype.

Characterization of *P. aeruginosa* isolates

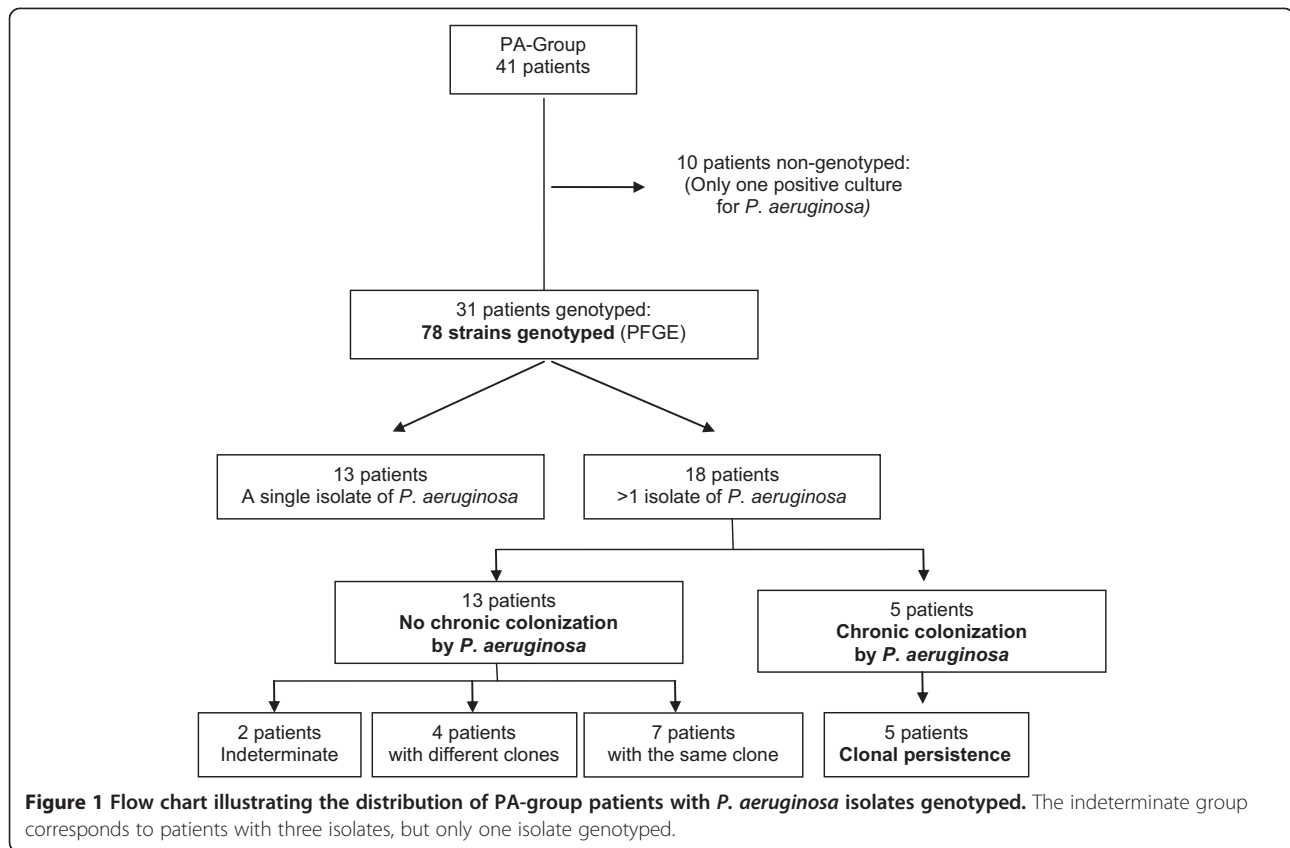
Ninety-two positive cultures of *P. aeruginosa* were recovered from 41 patients, with 78 isolates valid for genotyping, corresponding to 31 patients. Thirty-six clones were identified from these 78 isolates, specific for each patient, except in the case of one clone shared by two patients. Figure 1 shows the overall scheme of the PA group with *P. aeruginosa* genotyped, and Figure 2 shows the dendrogram of PFGE patterns for the 78 genotyped *P. aeruginosa* isolates.

Thirteen of 31 patients (41.9%) showed a single *P. aeruginosa* isolate with a single clone. Among the remaining 18 patients with repeated isolates of *P. aeruginosa*, 12 patients showed the same clone during follow-up, five of them fulfilling the criteria for chronic colonization. The assessment of mucoid morphotype in the genotyped samples demonstrated this morphotype in 11 isolates from five different patients (numbers 1, 25, 28, 30, and 36; in Tables 3 and 4) with three clones (P16, P26 and P4) adopting different morphotypes over time (Tables 3 and 4).

Thirty-seven isolates of *P. aeruginosa* analyzed were susceptible to all tested antibiotics (47.4%), 20 were resistant to one or two antibiotic groups (25.6%), while the remaining 21 were multidrug resistant (26.9%). The antibiotic resistance profile of the 78 genotyped *P. aeruginosa* isolates is shown in Table 5. Multidrug resistant isolates were retrieved in five patients (numbers 1, 13, 19, 25 and 29; in Tables 3 and 4), three of them chronically colonized. These three patients harbored 19 of the 21 multidrug resistant isolates observed (90%). The clones of all these patients showed fluctuations in antimicrobial susceptibility over time.

Discussion

Our study showed a high prevalence of *P. aeruginosa* isolation in a cohort of severe COPD patients. The extent of bronchiectasis and recurrent use of antibiotic therapy were the main risk factors for the recovery of this PPM from bronchial secretions. Most patients in the PA group had single isolates of *P. aeruginosa*, but up to 12% of patients met criteria for chronic colonization by this PPM, though this clinical situation was not related to the presence of bronchiectasis. Furthermore, clonal persistence was



observed in this subset of patients, as previously reported in patients with cystic fibrosis.

Prevalence and risk factors for *P. aeruginosa* isolation

We recovered *P. aeruginosa* from sputum in nearly 40% of the severe COPD patients in our series, half of whom presented bronchiectasis. These figures were similar to those reported in previous studies in patients with advanced disease, as shown by Murphy et al. [30] and Renom et al. [9], who reported *P. aeruginosa* isolation in over one third of the sputum samples obtained from COPD patients.

A strong relationship between the extent of bronchiectasis and *P. aeruginosa* recovery was observed in our study. Bronchiectasis have been often reported in severe COPD [10,21,31] but the association between bronchiectasis and *P. aeruginosa* isolation have been only marginally addressed in previous studies. García-Vidal et al. [8] analyzed 188 patients with moderate to severe COPD admitted to hospital for a COPD exacerbation and studied by HRCT identifying bronchiectasis in 52% of them, without finding significant relationships between bronchiectasis and *P. aeruginosa* isolation. In a similar population of 201 COPD patients Martínez-García et al. [22] observed that the isolation of *P. aeruginosa* was significantly more frequent in patients with bronchiectasis (13% versus 4.7%). Our study demonstrated that in COPD patients with

advanced disease the relationship between bronchiectasis and the recovery of *P. aeruginosa* is clearly defined and associated with the extent of the bronchial abnormality. Additionally, among the other risk factors evaluated for *P. aeruginosa* isolation in our study, only the number of previous antibiotic treatments was independently associated with the recovery of this PPM in our study, after accounting for covariates in the multivariate analysis. This finding is in agreement with previous studies that have found a relationship between antibiotic treatments and the subsequent isolation of *P. aeruginosa* in sputum samples [7,8]. The lack of a relationship in the multivariate analysis between previous hospital admissions and *P. aeruginosa* recovery in our study may be attributed to the differences in study design, because the present study focus on patients regularly attending an outpatient day care facility, or to the higher weight of recurrent antibiotic treatments as a predictor. Although the present study was not designed to evaluate mortality, we observed a higher death rate during the follow-up in the PA group, in agreement with other authors [9,32].

Characterization of *P. aeruginosa* isolates in chronic colonization

Near 50% of COPD patients (PA-group) had repeated isolates of *P. aeruginosa*, accomplishing criteria of chronic

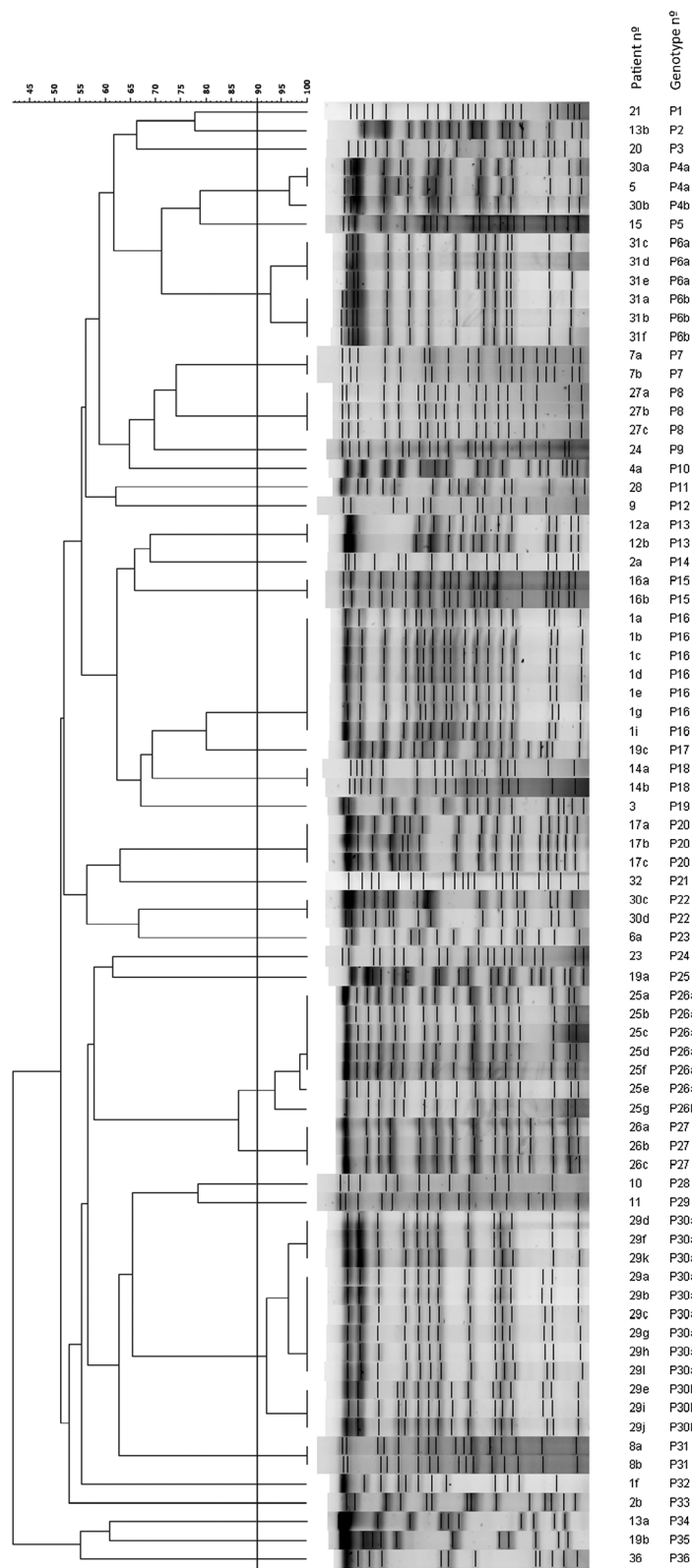


Figure 2 Dendrogram of PFGE patterns for 78 *P. aeruginosa* isolates. A genetic similarity index scale is shown above the dendrogram. The line in the dendrogram denotes the homology threshold of 90% used for defining groups of genetic similarity.

Table 3 Characteristics of *P. aeruginosa* isolates genotyped in patients who met criteria for chronic bronchial colonization by *P. aeruginosa*

| Patient isolates | PFGE Genotype | ECOPD | Isolation date | Morphotype |
|------------------|-------------------|-------|----------------|--------------------------------------|
| 1e | P16 | No | 24/Mar/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 1f | P32 | No | 24/Mar/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 1a | P16 | Yes | 10/Jan/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 1b | P16 | No | 16/Feb/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 1g | P16 | Yes | 21/Mar/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 1i | P16 | Yes | 21/Mar/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 1c | P16 | Yes | 23/Apr/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 1d | P16 | Yes | 31/May/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 25a | P26 ^{a1} | Yes | 18/Aug/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 25b | P26 ^{a1} | No | 3/Nov/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 25c | P26 ^{a1} | Yes | 5/Dec/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 25d | P26 ^{a1} | No | 9/Jan/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 25e | P26 ^{a2} | No | 17/Mar/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 25f | P26 ^{a1} | Yes | 11/Jan/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 25g | P26 ^b | Yes | 23/Apr/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 26a | P27 | Yes | 10/Oct/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 26b | P27 | Yes | 12/Nov/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 26c | P27 | No | 14/Dec/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29a | P30 ^{a2} | Yes | 2/Mar/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29b | P30 ^{a2} | No | 17/Jun/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29c | P30 ^{a2} | Yes | 9/Nov/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29k | P30 ^{a1} | Yes | 12/Dec/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29l | P30 ^{a2} | Yes | 12/Dec/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29d | P30 ^{a1} | No | 23/Jan/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29e | P30b | No | 3/Jul/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29f | P30 ^{a1} | No | 18/Sep/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29g | P30 ^{a2} | No | 7/Nov/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29h | P30 ^{a2} | No | 27/Dec/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29i | P30 ^b | No | 12/Sep/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 29j | P30 ^b | No | 17/Dec/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 31a | P06 ^b | Yes | 9/Oct/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 31b | P06 ^b | No | 21/Nov/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 31c | P06 ^a | Yes | 22/Mar/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 31d | P06 ^a | No | 27/Apr/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 31e | P06 ^a | Yes | 4/Sep/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 31f | P06 ^b | No | 17/Oct/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

Patients are identified by numbers and different isolates by letters. The PFGE clones are identified by numbers and the superscript indicates same clones with a Dice coefficient between 90-99%.

colonization by this PPM in over 10% of cases. Similarly, Martinez- García et al. [31] found chronic colonization by *P. aeruginosa* in 11/201 moderate-to-severe COPD patients. The molecular characterization of *P. aeruginosa* isolates in our COPD cohort demonstrated the persistence

of the same clone in two thirds of them and in all chronically colonized patients.

Few studies to date have evaluated chronic colonization by *P. aeruginosa* in COPD patients and those that have been performed have showed conflicting results. Studies

Table 4 Characteristics of *P. aeruginosa* isolates genotyped in patients without criteria for chronic bronchial colonization by *P. aeruginosa*

| Patient isolates | PFGE Genotype | ECOPD | Isolation date | Morphotype |
|------------------|------------------|-------|----------------|--------------------------------------|
| 2a | P14 | Yes | 17/Oct/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 2b | P33 | Yes | 15/Feb/08 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 3 | P19 | Yes | 17/Oct/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 4 | P10 | Yes | 2/Jun/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 5 | P04 ^a | Yes | 22/Mar/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 6 | P23 | Yes | 4/Jul/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 7a | P07 | Yes | 1/Dec/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 7b | P07 | No | 12/Nov/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 8a | P31 | No | 8/Sep/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 8b | P31 | No | 12/Dec/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 9 | P12 | Yes | 14/Dec/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 10 | P28 | Yes | 10/Aug/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 11 | P29 | Yes | 5/Oct/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 12a | P13 | Yes | 7/Apr/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 12b | P13 | No | 18/Oct/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 13a | P34 | Yes | 30/May/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 13b | P02 | Yes | 11/Oct/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 14a | P18 | Yes | 28/Jan/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 14b | P18 | Yes | 28/Jul/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 15 | P05 | Yes | 2/Feb/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 16a | P15 | Yes | 23/Nov/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 16b | P15 | Yes | 3/Jan/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 17a | P20 | Yes | 3/Nov/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 17b | P20 | Yes | 22/Dec/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 17c | P20 | Yes | 8/Jun/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 19a | P25 | Yes | 19/Dec/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 19b | P35 | No | 12/Jun/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 19c | P17 | Yes | 3/Mar/08 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 20 | P03 | Yes | 28/Nov/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 21 | P01 | Yes | 4/Feb/08 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 23 | P24 | Yes | 6/Mar/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 24 | P09 | Yes | 30/Jun/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 27a | P08 | Yes | 20/Mar/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 27b | P08 | No | 12/Apr/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 27c | P08 | No | 25/Jul/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 28 | P11 | Yes | 11/Oct/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 30a | P04 ^a | Yes | 10/Jan/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 30b | P04 ^b | No | 21/Feb/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 30c | P22 | No | 19/Dec/07 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 30d | P22 | Yes | 8/Feb/08 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 36 | P36 | Yes | 23/May/05 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid |
| 32 | P21 | Yes | 10/Nov/06 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

Patients are identified by numbers and different isolates by letters. The PFGE clones are identified by numbers and the superscript indicates same clones with a Dice coefficient between 90-99%.

Table 5 Antibiotic resistance profile of 78 *P. aeruginosa* isolates

| Antibiotic group | Antibiotic | Number of susceptible strains (%) |
|------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Quinolones | | 39 (50.0) |
| | Ciprofloxacin | 37 (47.4) |
| | Levofloxacin | 39 (50.0) |
| Aminoglycosides | | 63 (80.8) |
| | Tobramycin | 54 (69.2) |
| | Amikacin | 61 (78.2) |
| | Gentamicin | 37 (47.4) |
| Penicillins | | 63 (80.8) |
| | Ticarcillin | 58 (74.4) |
| | Piperacillin tazobactam | 63 (80.8) |
| Cefalosporins | | 58 (74.4) |
| | Ceftazidime | 58 (74.4) |
| | Cefepime | 51 (65.4) |
| Carbapenems | | 62 (79.5) |
| | Imipenem | 50 (64.1) |
| | Meropenem | 62 (79.5) |
| Polymyxins | Colistin | 76 (97.4) |
| Monobactams | Aztreonam | 59 (75.6) |

assessing *P. aeruginosa* isolates by PFGE from COPD respiratory samples showed a chronic infection pattern similar to cystic fibrosis [14,15] in a limited number of COPD patients. Conversely, in a 10-year follow-up study which included 126 COPD patients, Murphy et al. [30] observed two distinct patterns of carriage of *P. aeruginosa*: a more frequent pattern of short-term carriage followed by clearance of the strain in up to half of episodes, and a persistence pattern of the same strain in a quarter of the episodes. Rakhimova et al. [13] genotyped *P. aeruginosa* isolates from this cohort and compared them with strains recovered from patients with cystic fibrosis showing chronic *P. aeruginosa* infection (n = 128), concluding that sporadic or intermittent infection with *P. aeruginosa* was the most common finding in bronchial secretions from COPD patients, who presented a frequent clone turnover, a pattern that differs from the chronic carriage of *P. aeruginosa* clones found in cystic fibrosis. Our results confirm that although the most frequent pattern in severe COPD is a self-limited isolation of *P. aeruginosa*, over ten per cent of severe patients show chronic colonization by *P. aeruginosa*, with clonal persistence pattern in close similarity with cystic fibrosis. A relationship with the extent of bronchiectasis was not observed in our study in this subset of patients, however. Determinants other than bronchiectasis that were not evaluated in our study, such as virulence factors or biofilm production, could explain the ability of *P. aeruginosa* to colonize these patients [14].

More than half of the isolates recovered from chronically colonized patients who harbor the same clone showed multidrug resistance and presented fluctuations in their antimicrobial susceptibility over the time. This variability in the antibiogram of *P. aeruginosa* has been reported previously [33] in cystic fibrosis, suggesting a polyclonal population that may not be well represented in sputum cultures. Similarly, some *P. aeruginosa* clones in our study adopted both mucoid and non-mucoid phenotypes during the follow-up, a finding that has also been reported in cystic fibrosis [34]. Finally, although the mucoid morphotype is considered a marker of colonization [35], in our study it was mainly related to high score of bronchiectasis.

Limitations

Patients from a selected COPD population participated in this study and our results can not be extrapolated to the COPD population as a whole. Only patients with severe COPD and frequent exacerbations who were managed on an outpatient basis at a day care facility were enrolled: results in these patients may not be applicable to patients who require recurrent admissions when exacerbation symptoms appear or has less severe disease. Additionally, microbiological analyses were performed only in spontaneous sputum samples, and no information on bronchial flora was obtained from patients or from episodes without sputum production. These limitations, however, do not reduce the significance of the results obtained, considering that spontaneous sputum production is the most common situation for these patients during exacerbations.

Conclusions

In summary, our study suggests a high prevalence of *P. aeruginosa* isolations in severe COPD patients. The extent of bronchiectasis and the number of antibiotic treatment regimens received were the main independent risk factors for the recovery of this PPM. Moreover, over one tenth of COPD patients met criteria for chronic colonization by *P. aeruginosa* and showed clonal persistence of this PPM regardless of the extent of bronchiectasis.

These findings have clinical implications for the management of severe COPD patients with frequent exacerbations, who may need the performance of CT scans and repeated sputum cultures for the identification of bronchiectasis and bronchial colonization by this PPM. *P. aeruginosa* must be considered a common causative agent in these patients, especially in those with a high extent in their bronchiectasis and receiving frequent antibiotic treatment. According to our data, a close follow-up may be recommended when *P. aeruginosa* is isolated in sputum cultures, for an early identification of chronic colonization, a situation which will require an approach similar to that applied in cystic fibrosis.

Competing interest

All authors declare not having competing interests that might have influenced the performance or presentation of our work in this manuscript.

Authors' contributions

This work is original and all authors meet the criteria for authorship, including acceptance of responsibility for the scientific content of the manuscript. Conception and design of the study: MG, CM, XP, EC Collection of samples: XP, CM, ME, MS Acquisition and interpretation of data: MG, EM, DS, EC, ME Writing the article: MG, XP, CM, EM. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Xavier Gallardo (X.G) for reviewing CT scans. We thank Michael Maudsley for providing an outline for this manuscript and support in editing and journal styling. We thank Jordi Vila and Francesc Marco for their critical review of this article.

Funding

This work has received funding from Fundació La Marató TV3 and SEPAR.

Author details

¹Department of Respiratory Medicine, Hospital de Sabadell, Institut Universitari Parc Taulí-UAB, Sabadell, Spain. ²Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Barcelona, Spain. ³CIBER de Enfermedades Respiratorias, CIBERES, Bunyola, Spain. ⁴Department of Microbiology, SDI UDIAT, Institut Universitari Parc Taulí-UAB, Sabadell, Spain. ⁵Department of Radiology, SDI UDIAT, Institut Universitari Parc Taulí-UAB. ⁶Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic-Fundació Clínic per la Recerca Biomèdica, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁷Epidemiology and Assessment Unit, Fundació Parc Taulí, Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, Spain.

Received: 28 March 2014 Accepted: 19 June 2014

Published: 26 June 2014

References

- Sethi S, Murphy TF: Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008, **359**:2355–2365.
- Moreno C, Montón Y, Belmonte M, Gallego X, Pomares X, Real J: **Causas de muerte en pacientes con EPOC grave. Factores pronósticos.** *Arch Bronconeumol* 2009, **45**:181–186.
- Murphy TF: **Pseudomonas aeruginosa in adults with chronic obstructive pulmonary disease.** *Curr Opin Pulm Med* 2009, **15**:138–142.
- Eller J, Ede A, Schaberg T, Niederman M, Mauch H, Lode H: **Infective exacerbation of chronic bronchitis. Relation between bacteriologic etiology and lung function.** *Chest* 1998, **113**:1542–1548.
- Miravittles M, Espinosa C, Fernández-Laso E, Martos JA, Maldonado JA, Gallego M, and study group of bacterial infection in COPD: **Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD.** *Chest* 1999, **116**:40–46.
- Monsó E, García-Aymerich J, Soler N, Farrero E, Felez MA, Antó JM, Torres A, EFRAM Investigators: **Bacterial infection in exacerbated COPD with changes in sputum characteristics.** *Epidemiol Infect.* 2003, **131**(1):799–804.
- Lode H, Allewelt M, Balk S, De Roux A, Mauch H, Niederman M, Schmidt-Ioannidis M: **A prediction model for bacterial etiology in Acute Exacerbations of COPD.** *Infection* 2007, **35**:143–149.
- García-Vidal C, Almagro P, Romani V, Rodríguez-Carballeira M, Cuchi E, Canales L, Blasco D, Heredia JL, Garau J: **Pseudomonas aeruginosa in patients hospitalised for COPD exacerbation: a prospective study.** *Eur Respir J* 2009, **34**:1072–1078.
- Renom F, Yáñez A, Garau M, Rubí M, Centeno MJ, Gorris MT, Medinas M, Ramis F, Soriano JB, Agustí A: **Prognosis of COPD patients requiring frequent hospitalization: Role of airway infection.** *Respir Med* 2010, **104**:840–848.
- Martínez-García MA, Soler-Cataluña JJ, Donat Y, Catalán P, Agramunt M, Ballestín J, Perpiñá-Tordera M: **Factors associated with bronchiectasis in patients with COPD.** *Chest* 2011, **140**:1130–1137.
- Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Garau J, Huchon G, Ieven M, Orqvist A, Torres A, van der Heijden G, Read R, Verheij TJ, Joint Taskforce of the European Respiratory Society and European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases: **Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections.** *Clin Microbiol Infect* 2011, **17**(Suppl. 6):E1–E59.
- From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): 2013. Available from: <http://www.goldcopd.org/>.
- Rakhimova E, Wiehlmann L, Brauer AL, Sethi S, Murphy TF, Tümmler B: **Pseudomonas aeruginosa population biology in chronic obstructive pulmonary disease.** *J Infect Dis* 2009, **200**:1928–1935.
- Martínez-Solano L, Maciá MD, Fajardo A, Oliver A, Martínez JL: **Chronic Pseudomonas aeruginosa infection in chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**:1526–1533.
- Valderrey AD, Pozuelo MJ, Jiménez PA, Maciá MD, Oliver A, Rotger R: **Chronic colonization by Pseudomonas aeruginosa of patients with obstructive lung disease: cystic fibrosis, bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010, **68**:20–27.
- 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**:196–204.
- Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ: **The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease.** *N Engl J Med* 2004, **350**:1005–1012.
- Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J: **Validation of a combined comorbidity index.** *J Clin Epidemiol* 1994, **47**:1245–1251.
- Pomares X, Monton C: **Respiratory day hospital: what have we learned?** *Med Clin (Barc)* 2011, **136**:454–455.
- Cantón R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, Alvarez A, Salcedo A, Oliver A, García-Quetglas E, Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient: **Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients.** *Clin Microbiol Infect* 2005, **11**(9):690–703.
- Patel IS, Vlahos I, Wilkinson TMA, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wilks M, Reznick RH, Wedzicha JA: **Bronchiectasis, exacerbation indices, and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **170**:400–407.
- Lynch DA, Newell JD, Tschomper BA, Cink TM, Newman LS, Bethel R: **Uncomplicated asthma in adults: comparison of CT appearances of the lungs in asthma and in healthy subjects.** *Radiology* 1993, **188**:829–833.
- Smith IE, Jurriaans E, Diederich S, Ali N, Shneerson J, Flower CDR: **Chronic sputum production: correlation between clinical features and findings on high resolution computed tomographic scanning of the chest.** *Thorax* 1996, **51**:914–918.
- Murray PR, Washington JA: **Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum.** *Mayo Clin Proc* 1975, **50**(6):339–344.
- Begoña Cacho J, Meseguer MA, Oliver A, Puig J: **Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones Bacterianas del tracto Respiratorio Inferior.** Madrid: SEIMC; 2007.
- Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig de la Bellacasa J, 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):1137–1144.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2004:M100–S114.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos S, Ozturk U, Ersoy Y, Aktas E, Gursory NC, Caliskan A: **The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of Acinetobacter baumannii, Escherichia coli and Klebsiella spp.** *Jpn J Infect Dis* 2009, **62**:372–377.
- Murphy TF, Brauer AL, Eschberger K, Lobbins P, Grove L, Cai X, Sethi S: **Pseudomonas aeruginosa in chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2008, **177**:853–860.
- Martínez-García MA, de la Rosa D, Soler-Cataluña JJ, Donat-Sanz Y, Catalán P, Agramunt M, Ballestín J, Valero I, Selma MJ, Roma A, Bertomeu M: **Prognostic**

- value of bronchiectasis in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **187**:823–831.
32. Almagro P, Salvadó M, García-Vidal C, Rodríguez-Carballeira M, Cuchi E, Torres J, Heredia J: *Pseudomonas aeruginosa* and mortality after hospital admission for chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2012, **84**:36–43.
 33. Foweraker JE, Laughton CR, Brown DF, Bilton D: Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2005, **55**(6):921–927.
 34. Hogardt M, Heesemann J: Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013, **358**:91–118.
 35. Novosad SA, Barker AF: Chronic obstructive pulmonary disease and bronchiectasis. *Curr Opin Pulm Med* 2013, **19**(2):133–139.

doi:10.1186/1471-2466-14-103

Cite this article as: Gallego et al.: *Pseudomonas aeruginosa* isolates in severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization and risk factors. *BMC Pulmonary Medicine* 2014 **14**:103.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

