



Departamento de Medicina

Programa de Doctorado: Medicina Interna

Interacción Microorganismo-Paciente en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Tesis Doctoral presentada por

Laura Millares Costas

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Eduard Monsó Molas

y la tutoría del Dr. Miquel Sabrià Leal

Laura Millares Costas

Doctoranda

Dr. Eduard Monsó Molas

Director

Dr. Miquel Sabrià Leal

Tutor

Febrero 2014

Eduard Monsó Molas, Profesor asociado de la Universidad Autónoma de Barcelona y Director del Servicio de Neumología del Hospital Universitario Parc Taulí y Miquel Sabrià Leal, Catedrático de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Germans Trias i Pujol

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada “Interacción microorganismo-paciente en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica” ha sido realizada por Laura Millares Costas bajo su dirección, y es apta para su defensa pública delante de un tribunal para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Dr. Eduard Monsó Molas

Dr. Miquel Sabrià Leal

Barcelona, Febrero 2014

A mi padre

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria completa.*

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Cuando hace ocho años llegué a este edificio perdido en la montaña, ni siquiera me imaginaba que llegaría este momento. Nunca había pensado en hacer una tesis doctoral, no estaba muy segura ni de lo que era, y ahora me encuentro escribiendo los agradecimientos, y pensando en todo el tiempo que ha pasado, y en todo lo que tengo que agradecer. Sinceramente, pensaba que no me costaría mucho esta parte. Después de escribir toda la tesis, pensaba que sería lo más fácil, pero ahora me doy cuenta de lo difícil que es expresar toda la gratitud que siento hacia la gente que ha estado a mi alrededor todo este tiempo.

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Eduard Monsó, mi director de tesis y jefe, el darme la oportunidad de hacer esta tesis. Aunque he tenido que esperar pacientemente mi momento, todo un logro para alguien bastante impaciente como yo, todos estos años trabajando en este grupo me han servido para aprender lo que realmente es dedicarse a la investigación, un trabajo que he descubierto que me encanta. Y sobre todo, agradecerle que siempre me haya sentido valorada y haya sentido que confiaba en mi trabajo y en mi criterio. También quiero agradecer al Dr. Miquel Sabrià la oportunidad de formar parte de este grupo y aceptar ser el tutor de esta tesis.

A mis compañeras de grupo, un grupo un poco peculiar en todo caso, pero bien avenido, que al final es lo que cuenta... Sara y Noemi, porque están aquí al lado soportando pacientemente mis constantes interrupciones pidiendo consejo y, sobre todo, soportando mi música!! Y por supuesto a Marian, por elegir "lo malo conocido" cuando llegó el momento, y por todos estos años trabajando con ella.

A las que comenzaron siendo mis compañeras de trabajo, luego pasaron a ser amigas y más tarde se convirtieron en "mi familia catalana", Sonia, Anna, Maribel, Eva y Mireia. Personas como vosotras hacen que el mundo sea mucho mejor, y sé que si no os hubiera conocido, los años que he pasado aquí no habrían sido tan buenos. Formáis parte de mi vida, y quiero agradecer todos estos años a mi lado, todo el apoyo y todo el cariño que me habéis dado.

He tenido la suerte además de coincidir con mucha gente en el laboratorio, por algo llevo aquí 8 años!! La lástima es que muchos ya no están tan cerca, pero siempre les agradeceré el tiempo compartido. Las locas de la UTE, Olga y Neus, porque con vosotras cerca siempre había un motivo para reírse, porque no todo en esta vida es trabajar... Ahora el laboratorio está mucho más tranquilo sin vuestros chillidos y bromas, por lo que somos un poquito más eficientes, pero se echa de menos vuestra compañía, a veces da la sensación de que el laboratorio esté vacío.. Sergio, el chico que no pegaba en un laboratorio, gracias por tu visión tan peculiar de las cosas. Y como no, Aida, por todos los años sentada a mi lado, ayudándome con las diluciones, las gráficas y todas las dudas que constantemente me surgían.

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente, a Vanesa y Marina por todos estos ratos compartidos, a Pepe por tener la paciencia de enseñarme a metilar y tener siempre la respuesta y la broma adecuada, a Cris e Itziar, por los ratillos de conversación por las escaleras, o por genómica, o haciendo un gel, o por donde haga falta! y a Eugeni, porque siempre me hace reír. Y a todos los compañeros del edificio no científicos, como no a Maribel, por recibirnos todas las mañanas con una sonrisa, y a Jose, por alegrarme cada mañana con las cosas bonitas que me dice.

Y no me olvido de mis nuevas compañeras del Parc Taulí, por haberme recibido en aquel maravilloso “zulo” al que llaman Washington nou... Menos mal que la falta de ventanas queda compensada por vosotras.

Me gustaría agradecer a mis amigas de toda la vida, Saioa, Naroa, Cristina, Ane y Raquel, por estar a mi lado desde pequeñas y porque volver a Donosti y encontrarme con vosotras me llena de energía y de fuerza para regresar a Barcelona. Y también a Yael, porque como una vez me dijiste, yo soy la confirmación de que a veces las primeras impresiones son engañosas. Gracias por tu amistad y por todos estos años de sabios consejos.

Y por último, pero no por ello menos importante, a toda mi familia que, aunque en la distancia, siempre ha estado muy presente. Para que veáis que lo de la tesis no

era una invención mía para justificar todos los años que he estado aquí. Ahora veis el resultado y por fin tenéis la excusa perfecta para venir a visitarme a Barcelona. A mi madre, ama, sin ti nunca lo podría haber hecho, gracias por confiar en mí, y por darme la oportunidad de hacer siempre lo que he querido, sin ponerme ninguna pega, aunque fuera irme a Inglaterra a aprender inglés o venir a Barcelona para hacer un master, con lo que te gustaría que estuviera allí cerquita... Y a mis hermanos, porque tienen mucha paciencia por tener una hermana tan petarda como yo, pero sé que en el fondo, me queréis y me echáis de menos. Ojalá pudiera mi padre leer todo esto, pero sé que allí donde esté seguro que me está viendo, y sé que está muy orgulloso de mí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
INTRODUCCIÓN	1
1. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)	3
1.1 DEFINICIÓN	3
1.2 SÍNTOMAS.....	3
1.3 DIAGNÓSTICO	4
1.4 CLASIFICACIÓN DE LA EPOC.....	5
1.5 CAUSAS DE LA ENFERMEDAD	7
1.5.1 Consumo de tabaco.....	7
1.5.2 Tabaquismo pasivo.....	8
1.5.3 Quema de combustible biomasa	8
1.5.4 Contaminación atmosférica y exposición ocupacional	8
1.5.5 Factores genéticos	9
1.5.6 Edad y género.....	9
1.5.8 Otros factores.....	9
1.6 EPIDEMIOLOGIA DE LA EPOC.....	9
1.6.1 Prevalencia	9
1.6.2 Impacto de la EPOC	10
1.6.2.1 Mortalidad	10
1.6.2.2 Coste y carga de la enfermedad	10
1.7 FISIOPATOLOGÍA.....	10
1.7.1 Bronquitis crónica	11
1.7.2 Obstrucción de la vía aérea pequeña.....	11
1.7.3 Enfisema	12
1.7.4 Bronquiectasias	13
1.8 PAPEL DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ.....	15
1.8.1 Metaloproteinasa 9 (MMP-9)	15
1.10 COLONIZACIÓN BRONQUIAL	17
1.10.1 <i>Haemophilus influenzae</i>	18
1.10.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.11 PAPEL DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO DE LA MUCOSA RESPIRATORIA	23
1.9 EXACERBACIONES.....	24
2. EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	27
2.1 EQUIPOS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN	30
2.1.1 ROCHE 454 GS FLX.....	30
2.1.2 ILLUMINA	32
2.1.3 LIFE TECHNOLOGIES SOLiD.....	34
2.1.4 ION TORRENT (Life Technologies)	35
2.1.5 PACIFIC BIOSCIENCIAS RS	37
2.2 METAGENÓMICA Y MICROBIOMA HUMANO	38
2.2.1 Gen 16S ARNr	40
2.2.2 Análisis de la comunidad microbiana.....	42
2.3 MICROBIOMA EN EPOC	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
HIPÓTESIS	49
OBJETIVOS	51
RESULTADOS	53
1. EFECTO DE LA COLONIZACIÓN BRONQUIAL POR <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> EN LA RESPUESTA INMUNE LOCAL Y LA ACTIVIDAD DE LAS METALOPROTEINASAS EN PACIENTES CON EPOC ESTABLE.....	55
1.1 Resumen	55
1.2 Resultados	56

1.2.1 Características de los pacientes	56
1.2.2 IgA específica contra <i>H. influenzae</i>	58
1.2.3 Actividad de las metaloproteinasas	59
2. MICROBIOMA BRONQUIAL DE LOS PACIENTES CON EPOC SEVERA COLONIZADOS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA.	63
2.1 Resumen	63
2.2 Resultados	64
2.2.1 Características de los pacientes	64
2.2.2 Características microbiológicas de las muestras	65
2.2.3 Microbioma pulmonar	66
2.2.4 Variabilidad en el microbioma bronquial durante exacerbación.....	73
3. CAMBIOS EN EL MICROBIOMA BRONQUIAL RELACIONADOS CON LA SEVERIDAD EN LOS PACIENTES CON EPOC.	77
3.1. Resumen	77
3.2 Metodología	78
3.3 Resultados	79
3.3.1 Características de los pacientes	79
3.3.2 Microbioma bronquial	79
DISCUSIÓN	89
CONCLUSIONES	103
REFERENCIAS.....	107
ANEXO I. Compendio de publicaciones	123
ANEXO II. Otras publicaciones y comunicaciones a congresos del doctorando relacionadas con la temática de la tesis	155

ABREVIATURAS

A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
ATP	adenosina trifosfato
BAL	lavado broncoalveolar
C	citosina
CAT	COPD assessment test
CMOS	complementary metal-oxide-semiconductor
cols	colaboradores
DE	desviación estándar
dNTP	desoxirribonucleotido trifosfato
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FEV ₁	volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FVC	capacidad vital forzada
G	guanina
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HMW	high molecular weight protein
HR	hazard ratio
IC	intervalo de confianza
IgA	inmunoglobulina A
IF- γ	interferón gamma
IL	interleuquina
IMC	índice de masa corporal
IQR	rango intercuartil
ISFET	ion sensitive field effect transistor
kg	kilogramos
KO	Knock out
Kpb	kilobases
LDS	análisis discriminante lineal

LOS	lipooligosacárido
m	metros
MEC	matriz extracelular
mm	milímetros
ml	mililitro
MMP	metaloproteinasa de matriz
mMRC	modified British Medical Research Council Questionnaire
MPP	microorganismo potencialmente patógeno
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
ng	nanogramos
NGS	next generation sequencing
nm	nanometros
NTHi	<i>Haemophilus influenzae</i> no tipable
OH	grupo hidroxilo
OMS	organización mundial de la salud
OMP	proteína de membrana externa
OTU	unidad taxonómica operacional
PAC-EPOC	Phenotype and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease
PB	posbroncodilatación
pb	pares de bases
PCoA	análisis de coordinadas principales
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pg	picogramos
PPi	pirofosfato inorgánico
pred	predicho
s	segundo
SC	componente secretor
slgA	inmunoglobulina A secretora
SMRT	single molecule real time sequencing
T	timina
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
TIMP	inhibidor tisular de metaloproteinasa

TNF- α	factor de crecimiento transformante alfa
ufc	unidades formadoras de colonias
vs	versus
ZMW	zero-mode waveguide detector

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC).

1.1 DEFINICIÓN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica se define como una enfermedad respiratoria caracterizada fundamentalmente por una limitación crónica al flujo aéreo que no es totalmente reversible. Esta limitación al flujo aéreo, que se suele presentar en forma de disnea y, normalmente, es progresiva, se asocia a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas y gases nocivos, principalmente derivados del humo de tabaco. La EPOC se caracteriza también por la presencia de exacerbaciones y por la frecuente presencia de comorbilidades que pueden contribuir a la gravedad de la enfermedad [1].

1.2 SÍNTOMAS

Los síntomas característicos de la EPOC son disnea crónica y progresiva, tos crónica y producción de esputo. La disnea, o dificultad para respirar, es una de las mayores causas de incapacidad y ansiedad asociadas con la enfermedad. La tos crónica es normalmente el primer síntoma que aparece, inicialmente intermitentemente, para manifestarse después a lo largo de cada día, siendo a menudo productiva. La producción regular de esputo durante tres meses o más en dos años consecutivos es la definición epidemiológica de bronquitis crónica. Los pacientes que producen grandes cantidades de esputo pueden padecer de bronquiectasias subyacentes. Además, la presencia de un esputo purulento indica el aumento de la inflamación que identifica el comienzo de una exacerbación de causa bacteriana. La tos crónica o la producción de esputo pueden aparecer años antes que la limitación del flujo aéreo, y a la inversa, la limitación del flujo aéreo puede aparecer sin tos crónica o producción de esputo. Otros síntomas que pueden aparecer son fatiga, pérdida de peso y anorexia, mayoritariamente en pacientes con EPOC severa y muy severa. Son síntomas con importancia pronóstica y pueden indicar otras enfermedades como tuberculosis o cáncer de pulmón [1, 2].

1.3 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de la enfermedad se tiene que considerar en todas las personas que presenten disnea, tos crónica o producción de esputo, que hayan tenido una exposición a factores de riesgo, principalmente al humo de tabaco. La espirometría forzada es la prueba necesaria para hacer el diagnóstico clínico [1–3], al permitir identificar la limitación al flujo aéreo. Es una prueba no invasiva, sencilla, barata, estandarizada, reproducible y objetiva. El diagnóstico de la EPOC se basa en una disminución del flujo espiratorio, medido a través del FEV₁ (volumen espiratorio forzado en el primer segundo) y su cociente con FVC (capacidad vital forzada). Se considera que hay obstrucción al flujo aéreo si este cociente posbroncodilatación (PB) es inferior a 0,7. La utilización del cociente FEV₁/FVC PB comporta un riesgo de infradiagnóstico en edades jóvenes y de sobrediagnóstico en edades avanzadas, ya que el cociente disminuye con la edad [4], por lo que el diagnóstico de EPOC en individuos de edad avanzada que no hayan tenido exposición a factores de riesgo y con un FEV₁ PB normal puede ser sobreestimado.

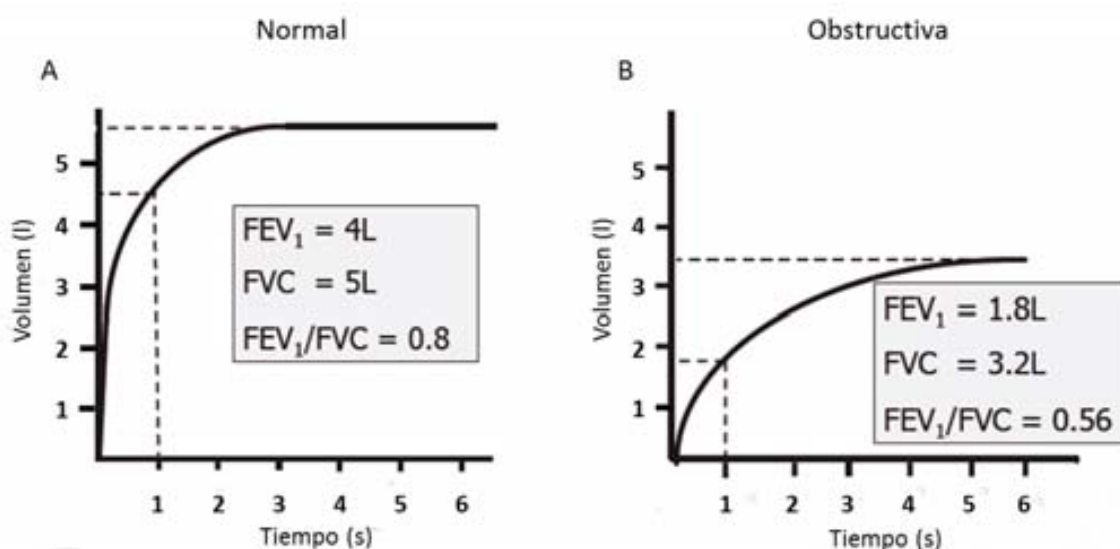


Figura 1. Espirometría en paciente normal (A) o con enfermedad obstructiva (B). Modificado de GOLD report 2013 [2].

Otras pruebas diagnósticas útiles son: a) radiografía simple de tórax, con una baja sensibilidad para detectar la EPOC, pero útil para la detección de enfisema; b) tomografía computarizada de tórax, que permite evaluar los cambios patológicos en la estructura pulmonar asociados a la EPOC; c) análisis de sangre, con hemograma y determinación del nivel de alfa-1-antitripsina; d) pulsioximetría, como medida no invasiva de la saturación de oxígeno de y e) prueba de marcha de 6 minutos, que consiste en medir la mayor distancia recorrida por el pacientes en ese tiempo, en terreno llano y siguiendo un protocolo estandarizado. Ésta es una prueba de referencia para determinar la capacidad de tolerancia a esfuerzo submáximo y ha demostrado ser un buen predictor de supervivencia y de la tasa de reingresos hospitalarios por exacerbación [1].

1.4 CLASIFICACIÓN DE LA EPOC

La clasificación de gravedad de la EPOC se ha basado durante muchos años en la determinación del grado de limitación al flujo aéreo, evaluado a través del FEV₁ PB. Varios estudios han demostrado que, tanto los valores basales de FEV₁ como su descenso anual, son poderosos predictores de mortalidad y morbilidad [5].

Tabla 1. Clasificación de la EPOC en función de la obstrucción al flujo aéreo.

En pacientes con FEV ₁ /FVC < 0,70		
GOLD 1	LEVE	FEV ₁ ≥ 80% predicho
GOLD 2	MODERADO	50% ≤ FEV ₁ < 80% predicho
GOLD 3	SEVERO	30% ≤ FEV ₁ < 50% predicho
GOLD 4	MUY SEVERO	FEV ₁ < 30% predicho

En la actualidad, sin embargo, se acepta que la EPOC es una enfermedad heterogénea y por tanto, un único parámetro como FEV₁, a pesar de ser de gran importancia, no permite clasificar adecuadamente a los pacientes. De esta forma, se han integrado diferentes marcadores con capacidad pronóstica en índices

multidimensionales para mejorar la clasificación de la enfermedad. El primer índice pronóstico que se generó, y que es considerado de referencia, es el índice BODE, propuesto por Celli y cols. [6]. Este índice integra la información del índice de masa corporal (IMC) (B, de body mass index), FEV₁ (O, de airflow obstruction), disnea (D) y capacidad de ejercicio (E), evaluada mediante la prueba de marcha de 6 minutos. Un incremento en un punto del índice BODE se asocia a un aumento del 34% en la mortalidad por todas las causas (hazard ratio [HR]= 1,34; IC del 95%, 1,26-1,42; p<0,001) y del 62% en la mortalidad de causa respiratoria (HR= 1,62; IC del 95% 1,48-1,77; p<0,001) [6]. En su conjunto, el índice BODE es más útil que el FEV₁ como variable pronóstica [1].

Tabla 2. Índice BODE

Marcadores		Puntuación			
		0	1	2	3
B	IMC (kg/m ²)	>21	≤21		
O	FEV ₁ (%)	≥65	50-64	36-49	≤35
D	Disnea (MRC)	0-1	2	3	4
E	6 MM (m)	≥350	250-349	150-249	≤149

El índice BODE oscila entre los 0 y 10 puntos, de mayor a menor riesgo de mortalidad, y se agrupa en cuatro cuartiles (cuartil 1: 0-2 puntos, cuartil 2: 3-4 puntos, cuartil 3: 5-6 puntos, cuartil 4: 7-10 puntos). Aunque la determinación de los cuatro componentes del BODE es relativamente sencilla, la generalización del índice se ha visto limitada por la necesidad de realizar la prueba de marcha de 6 minutos.

La última edición de la guía GOLD ha propuesto una clasificación multidimensional basada en la limitación al flujo aéreo, los síntomas de la enfermedad y el riesgo de exacerbación. Se valora la sintomatología con la escala de disnea de la mMRC (Modified British Medical Research Council Questionnaire) y/o con el cuestionario CAT (COPD Assessment Test) [7], de reciente creación.

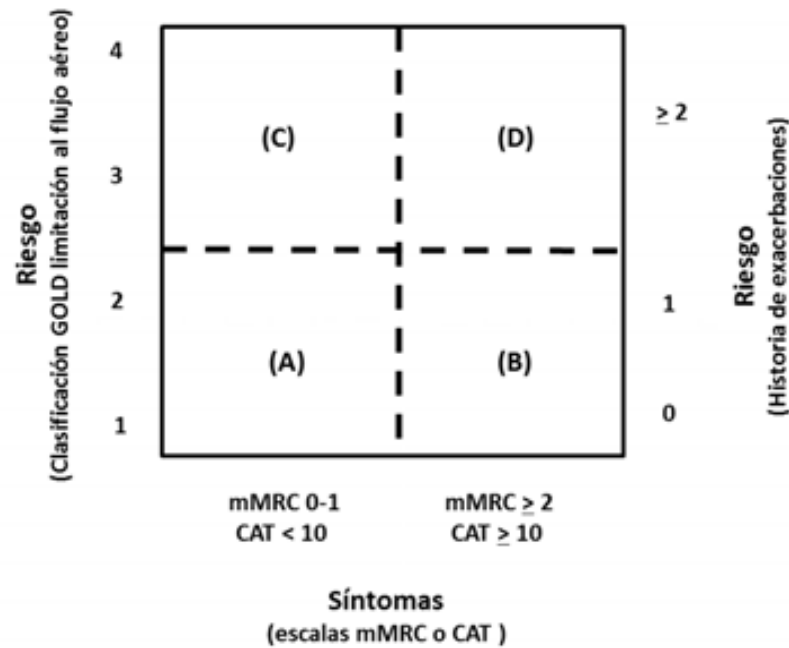


Figura 2. Clasificación GOLD. Modificado de GOLD Report 2013 [2].

La clasificación GOLD permite clasificar al paciente en uno de estos cuatro grupos, siendo el grupo A el más leve, en estadios GOLD 1 o GOLD 2, con una o ninguna exacerbación al año y un valor de mMRC de 0-1 o de CAT inferiores a 10. El grupo B se caracteriza por una misma severidad funcional (GOLD 1 o GOLD 2) pero mayor sintomatología (mMRC ≥ 2 o CAT ≥ 10), y una o ninguna exacerbación al año. Los pacientes del grupo C presentan pocos síntomas basales (mMRC de 0-1 o CAT <10), aunque su pérdida funcional puede ser elevada (GOLD 3 o GOLD 4) o su frecuencia de exacerbación alta (dos o más episodios al año). En el grupo D se encuentran los pacientes con función respiratoria muy afectada (GOLD 3 o GOLD 4) o frecuentes exacerbaciones al año y con síntomas muy altos en estabilidad (mMRC ≥ 2 o CAT ≥ 10) [2].

1.5 CAUSAS DE LA ENFERMEDAD

1.5.1 Consumo de tabaco

El tabaco es el factor de riesgo más importante en el desarrollo de EPOC [8, 9], y su relación causal se ha demostrado a partir de numerosos estudios de cohortes. Se

estima que el riesgo absoluto de desarrollar EPOC entre fumadores está entre el 25-30% [10]. Además, el riesgo de desarrollar esta enfermedad es proporcional al consumo acumulado de tabaco, de forma que pasa de un 26% de riesgo en los fumadores de 15-30 paquetes año a un 51% en los fumadores de más de 30 paquetes al año [11]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la EPOC es importante la interacción genética y ambiental. Entre personas con el mismo historial tabáquico no todos desarrollarán EPOC, debido a diferencias en la predisposición genética, o en la duración de su vida. Además, los factores de riesgo de la enfermedad pueden relacionarse de una manera más compleja [2].

1.5.2 Tabaquismo pasivo

El tabaquismo pasivo, o también llamado humo ambiental de tabaco, se define como la inhalación involuntaria del humo de otra persona que fuma tabaco. Entre las personas no fumadoras que desarrollan EPOC, se ha demostrado que el tabaquismo pasivo se asocia a un mayor riesgo de EPOC [12–15].

1.5.3 Quema de combustible biomasa

La biomasa (madera, carbón vegetal, otras materias vegetales y el estiércol) y otros combustibles para uso en la calefacción o la cocina en países en vías de desarrollo se ha descrito como factor de riesgo de la EPOC en áreas rurales [16, 17]. En todo el mundo, aproximadamente el 50% de todas las casas y el 90% de las casas rurales usan el combustible de biomasa como su fuente principal de energía doméstica, por lo que es un factor de riesgo a tener en cuenta.

1.5.4 Contaminación atmosférica y exposición ocupacional

Los contaminantes específicamente estudiados con su relación con EPOC son el ozono, las partículas en suspensión, el monóxido de carbono, el dióxido de sulfuro, el dióxido de nitrógeno y otros gases. La alta contaminación atmosférica, sobre todo asociada al tráfico rodado, es un factor desencadenante de exacerbaciones de EPOC en individuos susceptibles. La exposición ocupacional a diversos polvos, gases y humos tóxicos se asocia a un mayor riesgo de EPOC, incluso después de tener en cuenta los factores como el tabaco [16, 18].

1.5.5 Factores genéticos

El déficit de alfa-1-antitripsina provoca una disminución acelerada de la función pulmonar. La α -1-antitripsina es una proteína de la superfamilia de los inhibidores de las serín proteasas, cuyo principal papel es inactivar la elastasa producida por los neutrófilos, y otro tipo de proteasas, para mantener el equilibrio proteasa-antiproteasa. Es una enfermedad autosómica de expresión recesiva responsable del 1% de los casos de EPOC y del 2-4% de enfisema [2, 19].

1.5.6 Edad y género

La edad se suele considerar como un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad. No está claro si el envejecimiento por si solo provoca la enfermedad o si la edad refleja la suma de exposiciones a lo largo de la vida. En cuanto al género, en el pasado muchos estudios reflejaron que la prevalencia y mortalidad de la EPOC era mayor en hombres que en mujeres, pero en la actualidad, datos de países desarrollados [20, 21] muestran que la prevalencia de la enfermedad es casi equivalente entre hombres y mujeres, probablemente reflejando los cambios que se han observado en el hábito tabáquico [2].

1.5.8 Otros factores

Otros factores de riesgo son el desarrollo del pulmón durante la gestación y crecimiento, las exposiciones durante la infancia y adolescencia, las infecciones respiratorias repetidas del niño o adulto en edades tempranas, factores socioeconómicos y la tuberculosis pulmonar [1].

1.6 EPIDEMIOLOGIA DE LA EPOC

1.6.1 Prevalencia

La organización mundial de la salud (OMS) estima que actualmente hay 210 millones de personas en el mundo que presentan EPOC [22]. En una revisión sistemática se estima que la prevalencia de EPOC en la población general es de alrededor del 1% en todas las edades, incrementándose al 8-10% o superior en aquellos adultos de 40 años o más [1, 23]. En Europa, la prevalencia varía entre 2,1% y

26,1% dependiendo del país, pero hay que tener en cuenta que cada territorio utiliza diferentes métodos para valorar la prevalencia y la gravedad, y se estructura en grupos de población heterogéneos [1, 24]. En España, la prevalencia actual de la EPOC, definida por el criterio GOLD como un cociente $FEV_1/FVC < 0,70$ posbroncodilatador en la población de 40-80 años se estima entre 5 - 10% (15,1% en hombres y 5,7% en mujeres) [2, 11, 25]. De acuerdo a la severidad de la enfermedad, la prevalencia varía de un 84,4% en los pacientes con enfermedad leve, un 15,5% en los moderados y un 2% en los pacientes con enfermedad severa [25].

1.6.2 Impacto de la EPOC

1.6.2.1 Mortalidad

La EPOC es actualmente la cuarta causa de muerte en el mundo y la OMS estima que será la tercera en el año 2030 [1, 26]. Este incremento en la mortalidad es debido al aumento del hábito tabáquico en las décadas precedentes, la reducción de mortalidad por otras enfermedades comunes (enfermedades infecciosas, fallo cardiaco) y el envejecimiento de la población mundial [2]. La tasa de mortalidad por EPOC por 100.000 habitantes, ajustada por población mundial, en el año 2008 fue de 492,22 en hombres y 338,47 en mujeres. La mortalidad por EPOC en España, comparando las tasas ajustadas por población mundial, muestra una tendencia a la disminución durante la última década, tanto en hombres como en mujeres [1].

1.6.2.2 Coste y carga de la enfermedad

Debido a ser una enfermedad crónica y progresiva, la EPOC supone un coste elevado, tanto en consumo de recursos sanitarios como en pérdida de la calidad de vida relacionada con la salud de los pacientes. La estimación de los costes de la EPOC en España se estima en 750-1.000 millones de euros/año, incluyendo costes directos, indirectos e intangibles.

1.7 FISIOPATOLOGÍA

El humo de tabaco, así como los gases y partículas nocivas inhaladas provocan una respuesta inflamatoria en el pulmón. En los pacientes con EPOC esta respuesta inflamatoria está alterada y es la responsable de que la reparación tisular y los

mecanismos de defensa funcionen anormalmente, provocando fibrosis de las vías aéreas pequeñas, acompañada de destrucción del parénquima, que se manifiesta como enfisema. Estos cambios patológicos causan una limitación progresiva del flujo aéreo, principal característica de la enfermedad. Los mecanismos que provocan el engrosamiento y destrucción de la vía aérea son sólo parcialmente conocidos, y probablemente formen parte de un proceso multifactorial en el que interactúan determinantes genéticos y estímulos ambientales [4, 27].

A nivel patológico, las alteraciones que podemos encontrar en el pulmón de los pacientes con EPOC son:

1.7.1 Bronquitis crónica

La inflamación asociada con la bronquitis crónica aparece en el epitelio de las vías aéreas centrales, mayores de 4 mm de diámetro interno. Este proceso inflamatorio se asocia a un aumento en la producción del moco, defectos de funcionamiento en el sistema mucociliar y alteraciones de la barrera epitelial. Distintas células inflamatorias, tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa, participan en este proceso [4, 27, 28].

1.7.2 Obstrucción de la vía aérea pequeña

Aunque bronquitis crónica y obstrucción de la vía aérea pequeña se asocian frecuentemente, el sitio donde principalmente se produce el trastorno ventilatorio obstructivo es en la vía respiratoria pequeña (menor de 2 mm de diámetro). En este territorio del árbol bronquial se produce hiperplasia de las células epiteliales y se altera la reparación tisular, con un engrosamiento de la pared que obstruye el flujo aéreo. En el tejido pulmonar, como en otros tejidos, la apoptosis celular y la destrucción de la matriz extracelular se compensan continuamente para mantener la homeostasis. Sin embargo, aunque las células madre residentes en el pulmón son activadas por el daño epitelial, el humo de tabaco desregula el proceso de reparación mediado por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), lo que provoca fibrosis [4, 27, 28].

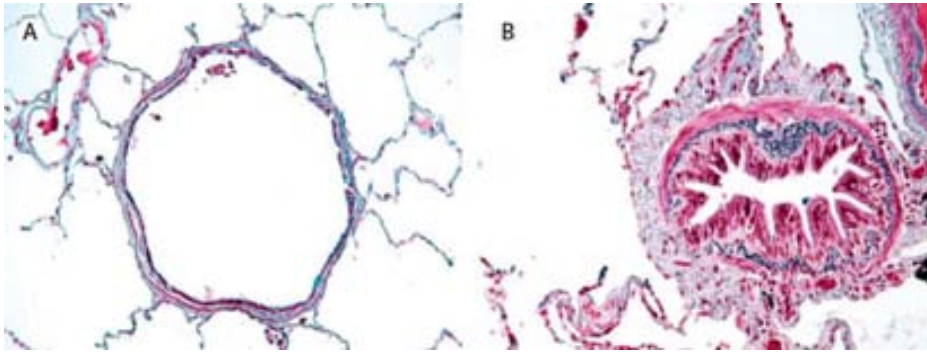


Figura 3. Diferencias en las vías aéreas de los individuos sanos (A) y los pacientes con EPOC (B), donde se ve una obstrucción al flujo aéreo por engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias. Modificado de Decramer y cols.[4].

1.7.3 Enfisema

El enfisema se define como el agrandamiento permanente de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales, con una destrucción de la pared alveolar, ocasionalmente con fibrosis manifiesta, lo que provoca una reducción del flujo espiratorio máximo. La relación entre la exposición al humo de tabaco, medido como paquetes-año, y la presencia de enfisema muestra una marcada relación dosis-respuesta.



Figura 4. Alveolo pulmonar normal y con enfisema. Imagen modificada de www.drugs.com [29].

1.7.4 Bronquiectasias

Se define como una dilatación anormal e irreversible de bronquios y bronquiolos que resulta en tos crónica, producción de esputo e infecciones bacterianas recurrentes. No son una enfermedad en sí misma, sino el resultado final de enfermedades diferentes que tienen aspectos comunes. Normalmente aparecen debido a ciclos repetidos de inflamación, infección y remodelado, con alteración en el sistema mucociliar y destrucción de la pared bronquial. Las bronquiectasias se asocian a infecciones respiratorias recurrentes que pueden ser severas y a una pérdida progresiva de la función pulmonar, y pueden provocar mortalidad prematura [30–33].

A nivel fisiopatológico, los mecanismos de defensa contra el daño causado por el humo del tabaco y otros irritantes los proporcionan la respuesta inflamatoria e inmune, innata y adaptativa. Los mecanismos de defensa innata incluyen el sistema mucociliar de la vía aérea, que junto con los macrófagos eliminan las partículas extrañas al organismo, y las células epiteliales, que producen una barrera física entre el espacio aéreo y el tejido pulmonar. Esta barrera protectora se modifica por la exposición continuada al humo de tabaco y desencadena la respuesta inflamatoria aguda. Se liberan moléculas relacionadas con el daño, que son reconocidas por receptores específicos, como los receptores *toll-like*, y desencadenan una respuesta inflamatoria no específica. Se liberan citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que reclutan macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Además, se liberan enzimas proteolíticos, como elastasas y metaloproteinasas de matriz (MMPs), y especies reactivas de oxígeno que cuando no son contrarrestadas por inhibidores de proteasas y antioxidantes, generan más daño en el tejido, favoreciendo que se perpetúe la respuesta inflamatoria.

Los componentes de la respuesta inmune adaptativa reaccionan ante los antígenos conocidos que llegan al pulmón. Los antígenos depositados en la superficie epitelial pueden ser transportados al interior por mecanismos especializados o pasan a través del tejido dañado. Las células dendríticas, que forman una red debajo de las células epiteliales, recogen los antígenos y los llevan hacia los ganglios linfáticos o hacia el tejido linfático bronquial, donde presentan los antígenos a las células T y B. Las

células T activadas, producen linfocitos T colaboradores CD4+ que estimulan el crecimiento y diferenciación de más células B que comienzan a producir anticuerpos y algunas permanecerán como células de memoria. Además, la respuesta inmune adaptativa celular ayuda en la destrucción de los microbios procesados por los macrófagos alveolares en la respuesta innata. Los linfocitos T colaboradores CD4+ reconocen el complejo antigénico expresada en la superficie de estos macrófagos y secretan interferón gamma (IF- γ) para activar la destrucción. Los linfocitos T citolíticos CD8+ reconocen las células nucleadas infectadas por patógenos intracelulares y las destruyen [4].

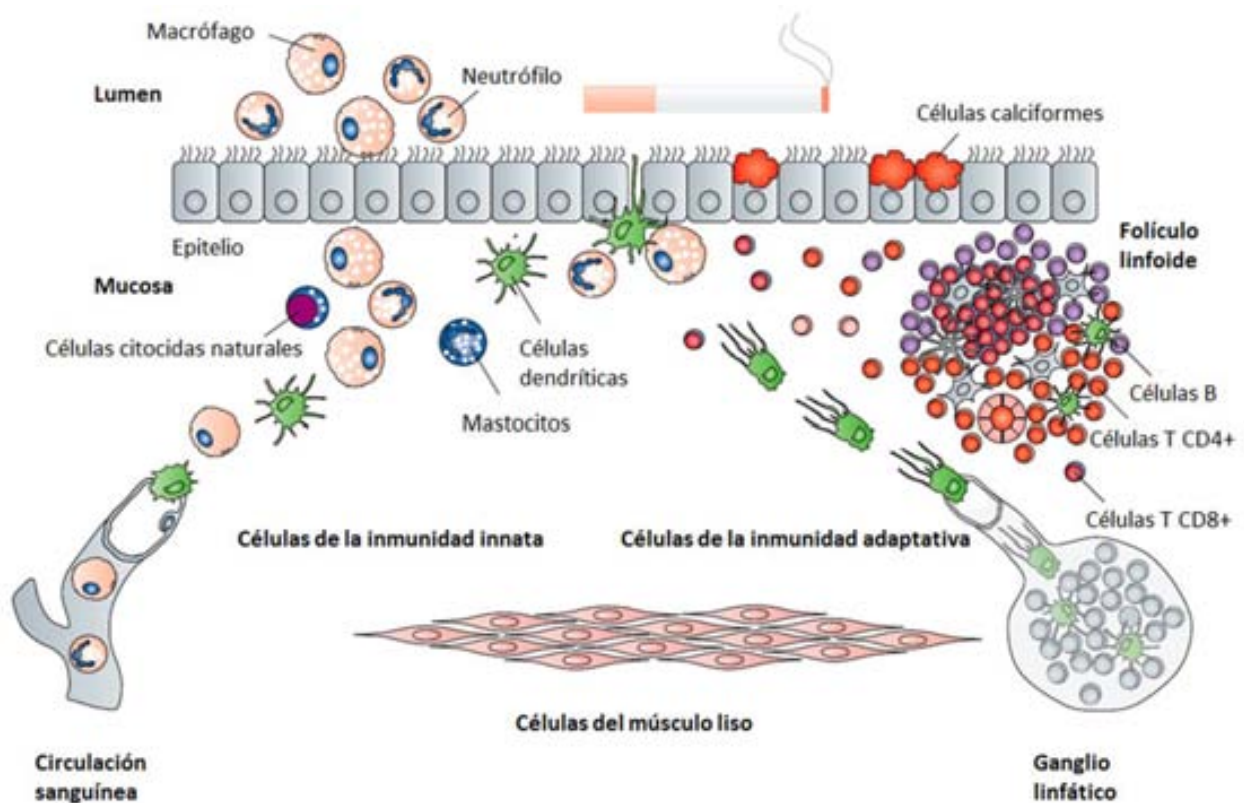


Figura 5. Células de la respuesta inmune innata y adaptativa que participan en el desarrollo de la EPOC. El humo de tabaco activa las células epiteliales y células de la respuesta inmune innata como los macrófagos, neutrófilos y citocidas naturales. Las células dendríticas activadas dirigen la respuesta inmune adaptativa, tanto la celular, con linfocitos T CD4+ y CD8+, como la humoral, con células B. Adaptado de Brusselle y cols. [27].

1.8 PAPEL DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que pertenecen a la superfamilia de las metzincinas. Son enzimas proteolíticas que tienen la capacidad de degradar los componentes de la matriz extracelular (MEC). Debido a su capacidad proteolítica, las MMPs pueden afectar a la adherencia de las células a la MEC, liberar fragmentos de ésta y atrapar mediadores del microambiente para facilitar que las células reaccionen. Su función principal es regular la integridad y composición de la MEC.

La síntesis y funcionamiento de las MMPs están regulados por tres mecanismos, la regulación transcripcional, el procesamiento post-transcripcional y la acción de sus inhibidores, entre ellos los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs). Los TIMPs son proteínas capaces de inactivar las MMPs a través de su unión directa al dominio catalítico de las MMPs, y al igual que las MMPs, su expresión está estrechamente regulada para mantener el equilibrio entre proteólisis e inhibición de la proteólisis. Los TIMPs inhiben las MMPs de manera estequiométrica 1:1 y reversible. Las MMPs contribuyen a la génesis del trastorno ventilatorio obstructivo en la EPOC al provocar una alteración en el remodelado de la MEC, induciendo colateralmente inflamación [34, 35].

1.8.1 Metaloproteinasa 9 (MMP-9)

Dependiendo de las características estructurales y del sustrato que degradan, las MMPs se dividen en diferentes subfamilias. La MMP-9 pertenece a la familia de las gelatinasas y tiene un dominio catalítico que incluye Zn^{2+} y tres dominios fibronectina tipo II capaces de unir gelatina, laminina y colágeno tipo I, II, III, IV y V [36]. La MMP-9 es producida principalmente por neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, así como linfocitos T y B. Es capaz de procesar múltiples sustratos, entre los que se incluyen proteínas de la matriz extracelular como la elastina, fibrilina, laminina y colágenos tipo IV, V, XI y XVI, pero también otro tipo de proteínas como proteasas, quimioquinas, citoquinas y receptores celulares. Los inhibidores de la MMP-9 son la α -2-macroglobulina y el inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (TIMP-1). Se han encontrado niveles elevados de MMP-9 en el lavado broncoalveolar (BAL) de los

pacientes con enfisema [37] y, comparado con los individuos sanos, los pacientes con EPOC muestran un aumento en la expresión y actividad de la MMP-9 en el esputo [38, 39]. Asimismo, se han encontrado niveles elevados del TIMP-1 en los pacientes con EPOC, con un ratio molar MMP-9:TIMP-1 significativamente más alto [40, 41]. La contribución que estas dos proteínas podrían tener en el progreso de la enfermedad se resume en la figura 6.

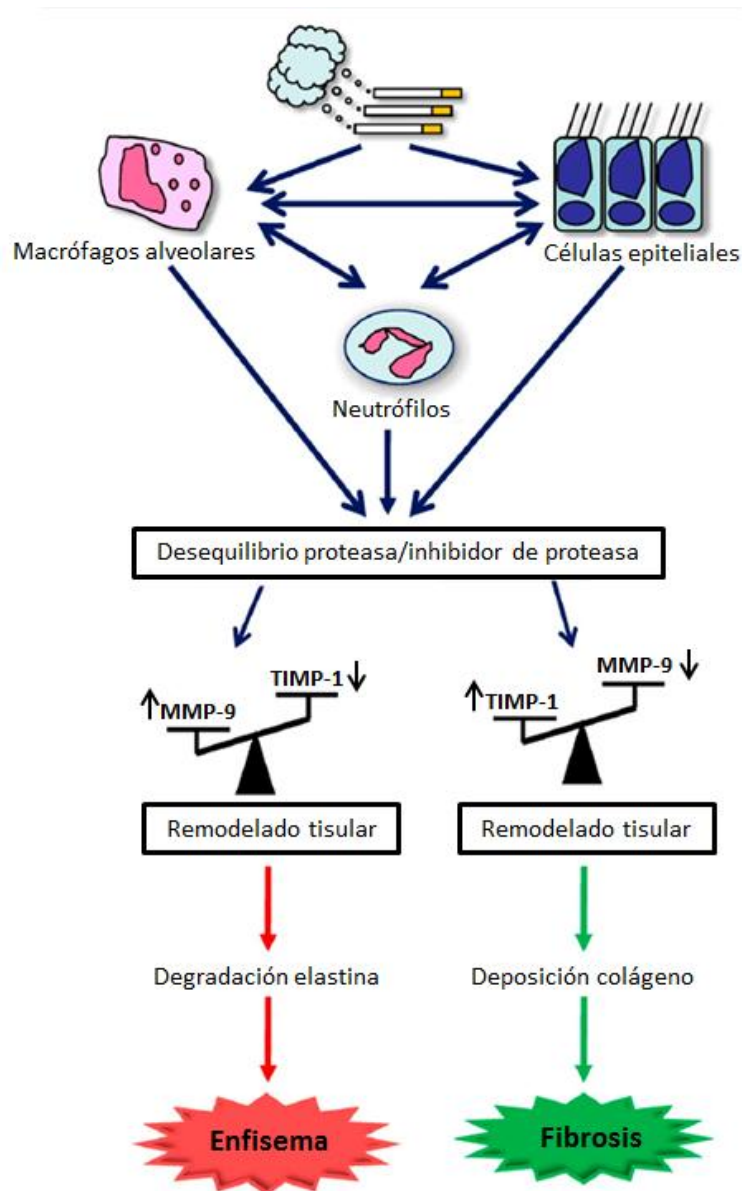


Figura 6. Papel del desequilibrio entre la MMP-9 y su inhibidor TIMP-1 en el desarrollo de la EPOC. Modificado de Lagente y cols.[42].

1.10 COLONIZACIÓN BRONQUIAL

El papel de los microorganismos, especialmente bacterias, en la historia natural de la EPOC es un tema controvertido. Son la principal causa de las exacerbaciones de la enfermedad, pero su papel durante las fases de estabilidad no está claro, aunque varios estudios sugieren que contribuyen a la inflamación crónica que conduce a la progresión de la enfermedad [43–47].

La mayoría de estudios que han analizado la colonización de los pacientes con EPOC se han basado en la detección e identificación de las bacterias mediante cultivos microbiológicos de muestras de secreciones respiratorias, como son el esputo espontáneo o inducido, el cepillo bronquial protegido y el BAL. Las bacterias aisladas se clasifican en microorganismos potencialmente patógenos (MPPs) y microorganismos no reconocidos como potencialmente patógenos (nMPPs). Dentro de los MPPs encontramos bacterias que son causa conocida de infección respiratoria, como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y otras menos frecuentemente etiológicas como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae*. De entre estos MPPs, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* son los más frecuentemente aislados en pacientes en estabilidad como colonizadoras, junto con *P. aeruginosa* en los pacientes con enfermedad más avanzada, siendo frecuente el aislamiento de más de un patógeno en un mismo paciente [47].

El porcentaje de cultivos positivos en los pacientes con EPOC en estabilidad depende en cierto grado del tipo de muestra recogida. Los estudios que han utilizado muestras de esputo han hallado un 38-74% de los cultivos positivos para MPPs [45–50]. Los estudios que han usado el cepillo bronquial protegido han encontrado niveles de colonización más bajos (22-83%), con MPPs aislados en un 25-31% de los casos [47, 51–55], y resultados similares se han hallado en muestras de BAL, positivas para MPPs en 33-43% de los casos [44, 47, 52, 54].

Los principales factores de riesgo para la presencia de colonización bronquial por MPPs son ser fumador o ex-fumador, tener el FEV₁ y/o FVC bajas, presentar comorbilidades, haber sufrido exacerbaciones previamente y la presencia de bronquiectasias. Otros indicadores clínicos son la presencia de esputo purulento o un

elevado grado de disnea [49, 55–57].

La colonización crónica por MPPs contribuye a la progresión de la enfermedad al amplificar la respuesta inflamatoria. La hipótesis del círculo vicioso intenta explicar cómo la colonización perpetúa la inflamación y contribuye al progreso de la EPOC. Una vez que los microorganismos han accedido a las vías respiratorias inferiores debido a los defectos en el sistema mucociliar, el aumento en la producción de moco, el daño en el epitelio, la represión en la producción de IgA y la disminución de la capacidad fagocítica celular, característicos de la enfermedad, facilitan la colonización de la vía aérea y provoca un aumento de la respuesta inflamatoria. Tanto la propia bacteria como el daño que genera en el epitelio contribuyen a alterar la respuesta inmune del huésped, de forma que más microorganismos son capaces de persistir en las vías respiratorias inferiores, formándose un ciclo vicioso de inflamación crónica y colonización bronquial mantenida en el tiempo.

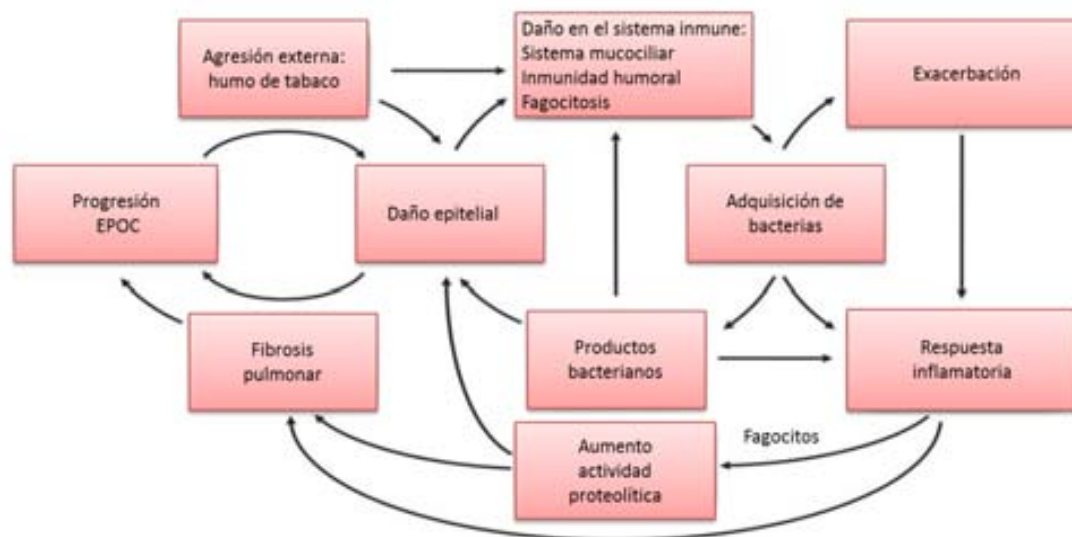


Figura 7. Hipótesis del círculo vicioso entre la colonización y la progresión de la enfermedad. Modificado de Garmendia y cols. [58]

1.10.1 *Haemophilus influenzae*

H. influenzae es un cocobacilo Gram negativo pleomórfico que crece tanto de forma aerobia como anaeróticamente, y requiere para su crecimiento aerobio de la presencia de hemina y de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Es un patógeno exclusivo humano que puede causar tanto infecciones en el tracto respiratorio como a

nivel sistémico [59].

Esta bacteria se divide en cepas tipables o no tipables, dependiendo de la presencia o no de una cápsula de polisacárido. Aparte de esta cápsula de polisacárido, las cepas son morfológica y metabólicamente similares, aunque sus manifestaciones clínicas son diferentes [60]. Las cepas tipables, las que presentan esta cápsula, se clasifican en 6 serotipos, de *a* hasta *f*, siendo el serotipo *b* el más frecuente (Hib), con un papel destacado en infecciones sistémicas como meningitis. Las cepas que no presentan la cápsula de polisacárido se denominan no-tipables (NTHi), y forman un grupo muy heterogéneo con diferentes subtipos. Estas cepas no tipables son las principales causantes de infecciones respiratorias y son consideradas patógenos de las mucosas [59]. Las cepas de NTHi disponen de varios mecanismos por los cuales son capaces producir infecciones respiratorias:

✓ **Interacción con el aparato mucociliar**

El sistema mucociliar es uno de los primeros mecanismos de defensa de las vías respiratorias contra la infección bacteriana. Las proteínas de membrana P2 y P5 que tiene *H. influenzae* facilitan la unión de la bacteria a la capa mucosa. Además, el lipooligosacárido (LOS) de la pared celular afecta la función ciliar. Denny y cols. [61] describió que el LOS de *H. Influenzae* producía una inhibición de la función ciliar y pérdida o muerte de las células ciliares. El mismo efecto se ha descrito para la proteína D, una lipoproteína que aparece en la superficie de la bacteria [62].

✓ **Anclaje a la mucosa respiratoria**

La habilidad para adherirse a la mucosa respiratoria es un determinante clave de la capacidad patogénica de la bacteria. Las cepas de NTHi tienen diferentes mecanismos por los cuales adherirse al tejido dañado:

- *Adhesinas*: hay dos subtipos principales, HMW1 y HMW2, proteínas de alto peso molecular con un amplio potencial de adhesión [63].
- *Pili*: son proyecciones lineales en la superficie de hasta 450 nm de longitud. Son capaces de aglutinar eritrocitos y de anclarse al epitelio respiratorio. Hay cinco tipos diferentes, presentes en un grupo reducido de cepas de NTHi.

- *Proteínas Hia y Hap*: Hia es una proteína autotransportadora de alto peso molecular homologa a Hsf, la mayor adhesina presente en Hib. Aparece en el 80% de las cepas de NTHi que no presentan adhesinas HMW1/HMW2 [60]. Hap es una segunda proteína autotransportadora que facilita la adherencia a células epiteliales a la matriz extracelular y ayuda en la formación de microcolonias [59, 63]. Aparece en las cepas incapaces de producir HMW1/HMW2 o Hia [60].

✓ **Evasión del sistema inmunitario**

Una vez que se han unido al epitelio respiratorio, la bacteria tiene mecanismos que aumentan su capacidad de persistir [59]:

- *Proteasas*: la inmunoglobulina A (IgA) es el principal anticuerpo que protege contra la infección epitelial al unirse a la bacteria y evitar su unión al epitelio, inactivar toxinas y facilitar la citotoxicidad. La subclase predominante es la IgA1. Las cepas de NTHi son capaces de producir endopeptidasas que se unen y neutralizan las IgA1.
- *Formación de microcolonias*: las cepas NTHi son capaces de producir microcolonias en la superficie epitelial. Esta propiedad parece que inhibe la función bacteriostática de lactoferrina, lisozima, y de los anticuerpos.
- *Cambio de fase y deriva antigénica*: el cambio de fase hace referencia a la habilidad de la bacteria a perder o ganar estructuras celulares, como LOS, adhesinas o pili, lo que tiene implicaciones importantes para la función de los anticuerpos y la proteína C reactiva. La deriva antigénica implica cambios permanentes en la secuencia de aminoácidos de epítopos importantes, el más conocido de los cuales es la proteína de membrana P2, muy inmunogénica.

✓ **Supervivencia intracelular**

Una característica patogénica muy importante de *H. influenzae* es su capacidad de invadir el tejido y sobrevivir intracelularmente en el tejido respiratorio, siendo los macrófagos y células epiteliales las principales dianas de esta bacteria.

NTHi está presente en el tracto nasofaríngeo de la mayoría de individuos

adultos sanos, y solo causa enfermedad en una minoría de ellos. Por tanto, la interacción entre el sistema inmune y la bacteria es fundamental en la patogénesis de las infecciones atribuibles a esta bacteria [59].

En los pacientes con EPOC NTHi es el microorganismo más frecuentemente aislado, tanto en periodos de estabilidad como durante las exacerbaciones [43, 64]. Todos los mecanismos descritos anteriormente intervienen en la colonización por NTHi. Una vez que accede al tracto respiratorio, la bacteria se encuentra con el sistema mucociliar dañado debido al humo de tabaco u otros factores, lo que favorece la colonización por la bacteria. Tanto el LOS como otros productos liberados por la bacteria estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias capaces de dañar el aparato mucociliar. Las proteasas IgA1 liberadas por las bacterias se adhieren e inactivan la sIgA1, facilitando la persistencia de la bacteria en la mucosa, a la que son capaces de adherirse mediante HMW1/HMW2, pili, Hia o Hap. Además Hap facilita la agregación de las bacterias lo que permite la formación de microcolonias aumentando así la capacidad de persistir en la mucosa. Finalmente, Hap y otros factores facilitan la entrada de las cepas al interior celular, donde sobreviven protegidas del sistema inmune.

1.10.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo que crece mejor en aerobiosis. Es muy versátil nutritivamente y no fermenta hidratos de carbono, pero produce ácido a partir de azúcares como la glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa. Se puede encontrar en diversos hábitats y causa en los humanos tanto infecciones agudas (de corta duración y severas) como infecciones crónicas (persistiendo durante un periodo largo de tiempo, con cepas resistentes al tratamiento y de severidad variable) [65].

Normalmente presenta un flagelo polar único y muchas fimbrias o pili en la superficie celular, siendo la mayoría de cepas capaces de producir un polisacárido extracelular (cápsula de exopolisacárido). *P. aeruginosa* tienen una membrana externa compleja, propia de las bacterias Gram negativas, con una gran cantidad de proteínas de membrana externa (OMP) que regulan el crecimiento y el metabolismo celular [65].

La versatilidad metabólica de este MPP, su resistencia a antibióticos, tanto

intrínseca como adquirida, su capacidad de formar biofilms y de producir varios factores de virulencia, hacen que esta bacteria sea capaz de generar una gran variedad de infecciones. Los mecanismos de virulencia de la bacteria incluyen factores estructurales, como el lipopolisacárido, pili y flagelos, que actúan conjuntamente con factores secretados como elastasas, proteasas, exotoxinas y pirocianina. La respuesta inmunitaria innata y adquirida, el lugar de la infección y las comorbilidades, entre otros, determinan si un factor de virulencia tiene un papel importante en la patogénesis [66].

En la EPOC, una infección aguda por *P. aeruginosa* puede evolucionar a una infección crónica. La transición a una fase crónica de infección viene facilitada por cambios fisiológicos celulares en respuesta a estímulos externos. La bacteria aumenta la producción de polisacáridos extracelulares, forma biofilms y se agrupa en colonias morfológicamente más pequeñas. Además, se produce una represión de los genes de virulencia y una sobreexpresión de los genes de resistencia a antibióticos[66].

P. aeruginosa se aísla en los cultivos de secreciones respiratorias de un 3-20% de los pacientes con EPOC en fase estable, y la frecuencia de la colonización aumenta con el empeoramiento de la obstrucción al flujo aéreo. Además, en un 3-10% de los pacientes que sufren una exacerbación, se aísla esta bacteria en secreciones de las vías aéreas inferiores. En estudios longitudinales se ha mostrado que la adquisición de una nueva cepa de *P. aeruginosa*, determinado por tipado molecular, se asocia a un aumento en el riesgo de sufrir una exacerbación [67].

El uso de antibióticos para el tratamiento de las infecciones agudas o crónicas de *P. aeruginosa* es un tema controvertido. No existe ningún estudio aleatorio controlado con placebo que demuestre que el tratamiento antibiótico contra esta bacteria cambie el pronóstico de la exacerbación [68]. Sin embargo, debido a la gran patogenicidad bacteriana y a la gravedad de las exacerbaciones en las que se aísla la bacteria, numerosas guías clínicas aconsejan el uso de antibióticos para erradicarla, como mínimo en los pacientes con enfermedad severa. Debido a la demora en los resultados del cultivo de esputo y a la necesidad inmediata del diagnóstico de la exacerbación, el médico debe decidir si el paciente tiene probabilidad de presentar una infección por *P. aeruginosa*. El mayor predictor de infección por *P. aeruginosa* es que ese paciente haya mostrado previamente cultivos de esputo positivos para esta

bacteria [68].

1.11 PAPEL DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO DE LA MUCOSA RESPIRATORIA

La mucosa de la vía aérea tiene una superficie aproximada de 100 m² y representa un reto para el sistema inmune ya que está continuamente expuesta a antígenos y biotoxinas inhaladas. La superficie mucosa proporciona una barrera física entre el interior del cuerpo y el exterior, por lo tanto, los mecanismos de defensa que aparecen en esta interfaz deben de ser diferentes. Mientras que en el parénquima la presencia de un microorganismo indica infección, la superficie mucosa está colonizada por una microbiota comensal y constantemente expuesta a antígenos ambientales. Así, mientras que el sistema inmune sistémico debe actuar de forma contundente ante la presencia de microorganismos, el sistema inmune de las mucosas debe mantener una microbiota normal mientras reacciona ante la presencia de MPPs.

El principal mecanismo de defensa de las vías respiratorias superiores e inferiores depende de la inmunoglobulina A secretora (sIgA), debido a su elevada capacidad de unión a antígenos y su resistencia a la proteólisis por la flora comensal [69]. Es la principal inmunoglobulina en las mucosas y la segunda más importante en circulación. Hay dos subclases, IgA1 e IgA2, con diferente distribución en suero y otras secreciones. En la mucosa respiratoria, la IgA1 representa más del 90% de la IgA total presente [60, 70].

La sIgA se produce localmente en células plasmáticas en forma de dímero o polímero, en contraste con la IgA presente en el suero que es monomérica y se sintetiza en las células plasmáticas de la médula ósea. Es liberada en las secreciones en forma de un complejo con el componente secretor (SC), la porción extracelular del receptor de inmunoglobulina polimérico, que permite el reconocimiento y el transporte selectivo a través de la mucosa epitelial. La sIgA protege las superficies mucosas mediante la unión a microorganismos o macromoléculas ambientales, previniendo su contacto con la superficie epitelial y facilitando su eliminación por el movimiento mucociliar, un mecanismo denominado exclusión inmune. La sIgA actúa también en la lámina propia donde se une a antígenos y los excreta al lumen a través de las células epiteliales por un mecanismo de transcitosis mediada por el receptor de

inmunoglobulina polimérico. Por este procedimiento es capaz también de inhibir la producción intracelular de virus y de neutralizar antígenos proinflamatorios que aparecen en los endosomas [71–74].

No existen muchos estudios sobre los niveles de IgA en los pacientes con EPOC. Se ha descrito una disminución en los niveles de IgA en el BAL de fumadores [75] y en un estudio que analizaba el nivel de IgA respecto al de albumina, se observó también una disminución de los niveles de IgA en estos pacientes [76]. Esto sugiere que la producción de IgA en la mucosa bronquial de pacientes con EPOC está alterada. Sin embargo, la respuesta sistémica mediada por IgA se ha hallado preservada en la EPOC [69, 77, 78].

1.9 EXACERBACIONES

La progresión de la enfermedad se agrava frecuentemente por la presencia de exacerbaciones. Éstas se definen como episodios de inestabilidad clínica caracterizados por un empeoramiento mantenido de los síntomas respiratorios que va más allá de su variación diaria. Los principales síntomas son empeoramiento de la disnea, la tos, el incremento del volumen y los cambios en el color del esputo, cambios sintomáticos que requieren tratamiento. En las exacerbaciones leves se aumentan las dosis de broncodilatadores, en las exacerbaciones moderadas es necesario el tratamiento con corticoesteroides sistémicos y/o antibióticos, y en las exacerbaciones severas se requiere ingreso hospitalario [1, 4].

En promedio, los pacientes con EPOC experimentan de 1 a 4 exacerbaciones al año [79]. Sin embargo, esta frecuencia es muy variable porque, mientras que algunos individuos no experimentan episodios, otros presentan exacerbaciones repetidas. La frecuencia de las exacerbaciones aumenta con la severidad de la enfermedad [4].

Las exacerbaciones reducen la calidad de vida, aceleran el progreso de la enfermedad y aumentan el riesgo de muerte. Debido a su impacto en la enfermedad, uno de los objetivos principales del tratamiento de estos pacientes es reducir el número de exacerbaciones. Lamentablemente no existen marcadores biológicos que las definan, se diagnostican únicamente en base a los síntomas clínicos.

Entre las causas de las exacerbaciones de la EPOC están el fallo cardiaco, la

neumonía, la embolia pulmonar, el no cumplir con el tratamiento inhalado y la inhalación de irritantes, como el humo de tabaco. Sin embargo, la causa más frecuente de exacerbación son las infecciones bacterianas o víricas (Tabla 3). En los pacientes con ingreso hospitalario debido a una exacerbación, se encontraron infecciones bacterianas, víricas o ambas en un 78% de los casos. Además, este tipo de exacerbaciones fueron más severas que las que no tuvieron causas infecciosas, cursando con un mayor empeoramiento de la función pulmonar y un ingreso hospitalario más largo [80]. El *gold standard* para el diagnóstico de una exacerbación por infección bacteriana es el aislamiento del MPP causal en el esputo. Este resultado no es inmediato, por lo que es necesario utilizar criterios clínicos para decidir si usar o no antibióticos. La presencia de un esputo purulento en vez de un mucoso, es uno de los métodos mejores y más rápidos para decidir si es necesario el tratamiento antibiótico [81, 82].

Tabla 3. Causas de las exacerbaciones de la EPOC

Infecciosas (60-80% de todas las exacerbaciones)
<ul style="list-style-type: none">Frecuentes (70-85% de las exacerbaciones infecciosas)
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>
Virus (virus influenza y parainfluenza, rinovirus y coronavirus)
<ul style="list-style-type: none">Infrecuentes (15-30% de las exacerbaciones infecciosas)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Oportunistas gram negativos
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
No infecciosas (20-40% de todas las exacerbaciones)
Fallo cardiaco
Embolia pulmonar
Infecciones no pulmonares
Neumotorax
Neumonía
Factores ambientales
Aire frío
Polución ambiental
Alérgenos
Tabaco
Incumplimiento del tratamiento

2. EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

La microbiología ha experimentado una revolución en los últimos 30 años a raíz de la aceptación de que el número de microorganismos cultivables es mucho menor que el de los no cultivables, y que además, es posible estudiar los microorganismos sin necesidad de cultivarlos.

Desde que en la década de 1880 Robert Koch formuló sus postulados y debido al gran énfasis por establecer los agentes causales de las enfermedades, los cultivos sólidos se adoptaron como la técnica estándar en el laboratorio microbiológico. La facilidad con la que algunos microorganismos crecen en los cultivos sólidos facilitó los estudios fisiológicos y genéticos en estos microorganismos, relegando durante muchos años el estudio de microorganismos no cultivables. Diversos descubrimientos a partir de la década de 1980, pusieron de manifiesto la importancia de estos microorganismos. Un trabajo de Colwell y cols. [83, 84] mostró que algunas cepas de *Vibrio cholerae*, a pesar de estar vivas y ser virulentas cuando se aislaban en medio acuático, no crecían en los cultivos hasta que no pasaban a través del intestino humano o de ratón. Este estudio puso las bases para el establecimiento del concepto de microorganismos viables pero no cultivables, de gran relevancia en salud humana. Por otra parte, en el aparato digestivo, a pesar de las evidencias microscópicas de que *Helicobacter pylori* estaba asociado a úlcera gástrica [85], hasta que 50 años más tarde no fue cultivada y satisfizo los postulados de Koch [86, 87], no se aceptó su papel en la úlcera, así como en el cáncer gástrico. Esto evidenció que años antes de que se cultivara la bacteria, se podrían haber tratado las enfermedades relacionadas con ella reduciendo significativamente la mortalidad. Todas estas evidencias contribuyeron a que muchos investigadores vieran la necesidad de estudiar los microorganismos no cultivables [88, 89].

En 1985 Pace y cols. [90] usaron las secuencias del gen 5S ARNr que encontraron en una muestra ambiental para describir la diversidad microbiana sin hacer cultivos. Este estudio generó resultados de gran interés pero, la corta longitud del gen, de aproximadamente 120 nucleótidos, limitaba la información que se obtenía del mismo. Esto propició el uso de moléculas más grandes, como es el caso del 16S ARNr [91], de una longitud aproximada de 1500 nucleótidos, que proporciona

suficiente información para los análisis filogenéticos.

Los pasos principales de esta técnica constaban de una extracción del ADN total de la comunidad bacteriana, la creación de una librería en el bacteriófago lambda, detección de 16S ARNr mediante hibridación con una sonda específica, seguida de secuenciación de los genes 16S ARNr contenidos en los clones y análisis comparativo de las secuencias obtenidas. La aparición de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la capacidad de diseñar cebadores con los que amplificar selectivamente el gen aceleró los estudios, facilitando el descubrimiento de nuevos taxones. La aplicación de la PCR proporcionó una visión realista de la diversidad microbiológica y puso de manifiesto que había una gran proporción de microorganismos no cultivables filogenéticamente muy diversos con respecto a los microorganismos conocidos [88, 89].

Sin embargo, los estudios que utilizaban el 16S para estudiar la microbiología no se extendieron debido a la complejidad y duración de la secuenciación tipo Sanger [92], la primera generación de las técnicas de secuenciación. Se basa en el empleo de nucleótidos modificados, dideoxinucleótidos, que carecen del grupo hidroxilo (-OH) del carbono 3', de forma que cuando la ADN polimerasa incorpora uno de estos dideoxinucleótidos, sin el grupo -OH necesario para hacer el enlace fosfodiéster, la cadena no puede continuar elongándose. Tradicionalmente se obtenía el ADN que se quería secuenciar mediante clonaje. Este ADN se desnaturalizaba para conseguir ADN de una sola hebra y se preparaban cuatro tubos de reacción, cada uno con el ADN, el cebador de secuenciación y los cuatro nucleótidos normales. A cada uno de estos tubos se le añadía una pequeña proporción de dideoxonucleótidos, sólo de un tipo en cada tubo. De esta forma, en cada tubo se producían cadenas de ADN de distintas longitudes, terminando todas en el lugar donde se añadió el dideoxinucleótido. Los productos de las 4 reacciones se cargaban en un gel y se hacía una electroforesis que permitía separar los fragmentos por tamaño. De esta forma se obtenía un patrón de bandas del que se podía deducir la secuencia de ADN.

La técnica de secuenciación se modificó al introducir dideoxinucleótidos marcados en el extremo 5', primero radiactivamente y luego con un marcaje fluorescente lo que permitió que la reacción se hiciera en un solo tubo. El marcaje fluorescente es lo que se utiliza hoy en día, de modo que cada uno de los

dideoxinucleótidos emite fluorescencia a una longitud de onda diferente, detectada por un sistema óptico. Además, los secuenciadores automáticos llevan a cabo una electroforesis capilar para separar los fragmentos, recogen los datos de fluorescencia y exportan los datos de secuenciación como cromatogramas.

Esta técnica de secuenciación ha dominado los estudios genómicos durante muchos años, consiguiendo logros como la secuenciación del genoma humano. Sin embargo, sus limitaciones mostraron la necesidad de incorporar nuevas técnicas de secuenciación, conocidas como secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés next-generation sequencing) [93, 94]. Los nuevos equipos de secuenciación aparecieron en el año 2005 y se caracterizan por tener diferentes mecanismos para la obtención de los datos y poder generar muchas más secuencias por carrera a un precio más barato. A partir de ese año, ha habido un gran desarrollo de la tecnología y las diferentes compañías han ido mejorando sus equipos para aumentar el número de secuencias generadas en cada carrera, aumentar la longitud de las secuencias, disminuir los costes y mejorar la precisión [95].

Estos equipos, también denominados de secuenciación masiva, a pesar de tener especificaciones diferentes, comparten ciertas características. La preparación de la muestra es más simple que en la secuenciación Sanger, en vez de un clonaje del ADN, la librería se forma mediante ligación de unos adaptadores, secuencias específicas de ADN, a los extremos del ADN que se quiere secuenciar. Además, estos equipos requieren una amplificación de la librería para asegurar que la reacción de secuenciación produce suficiente señal para que sea detectada. Y por último, estos aparatos producen una serie de reacciones secuenciales y repetitivas que se detectan automáticamente [95]. Las características de los equipos que podemos encontrar se detallan a continuación.

2.1 EQUIPOS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

2.1.1 ROCHE 454 GS FLX

Este secuenciador funciona mediante el principio de pirosecuenciación, que utiliza la molécula de pirofosfato liberada tras la incorporación de un nucleótido por la ADN polimerasa para impulsar una serie de reacciones que producen luz. También se usa el término secuenciación por síntesis para describir esta técnica, ya que la secuenciación se consigue al sintetizar la cadena complementaria del ADN molde.

Para comenzar, se crea la librería de ADN mediante amplificación del gen de interés o fragmentación del ADN. A cada uno de estos fragmentos de ADN se les añade unos adaptadores por ligación, lo que facilitará que se unan a unas microesferas de agarosa que están cubiertas de millones de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores. En la PCR de emulsión, mediante agitación de una mezcla de sustancias oleosas y acuosas, cada una de las microesferas, que contiene una única copia de ADN unida por hibridación, se aísla en una micela, que además contiene los reactivos necesarios para hacer la PCR. Estas pequeñas micelas se dispensan en los micropocillos de una placa especial para someterla a los ciclos de temperatura para la amplificación. En unas horas, se producen más de un millón de copias en cada microesfera. Posteriormente, estas microesferas se añaden a la superficie de una placa específica del aparato, que consiste en micropocillos formados por hebras de fibra óptica fusionadas donde se depositarán las microesferas individualmente (figura 8).

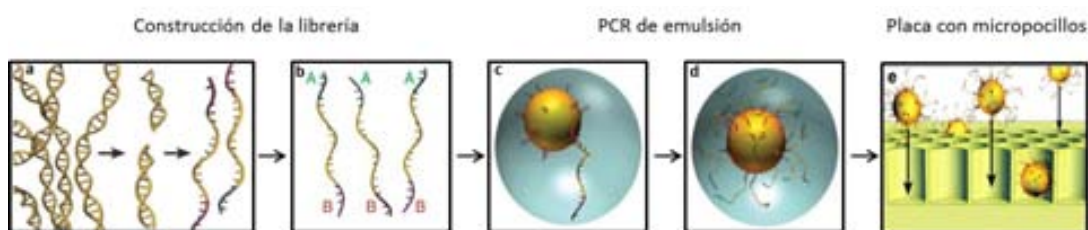


Figura 8. Flujo de trabajo en 454. Adaptado de Mardis ER [93].

Posteriormente se añaden unas nanoesferas magnéticas y de látex, de menor tamaño que las anteriores, que contienen los enzimas necesarios para la

pirosecuenciación, y rodean las microesferas de agarosa que contienen el ADN. La placa se introduce en el secuenciador donde el aparato va introduciendo los nucleótidos y los reactivos secuencialmente. Los flashes de luz emitidos por la actividad de la luciferasa cuando se añade uno de los cuatro nucleótidos se registra, siendo la luz proporcional a la cantidad de cada uno de los nucleótidos que se añade, hasta el nivel de saturación. Por eso, cuando hay homopolímeros, la intensidad de la señal puede ser mayor que la sensibilidad del detector y por tanto, en esas lecturas se pueden crear errores de inserción o deleción. El flujo secuencial de nucleótidos minimiza los errores por sustituciones en las secuencias. La secuencia introducida en el adaptador, con un patrón conocido, sirve para que el programa de análisis del aparato calibre la intensidad de luz emitida al añadir cada uno de las nucleótidos. Una vez registradas las señales, se traducen a secuencias y se efectúa un primer filtro para eliminar las secuencias de baja calidad [93, 94].

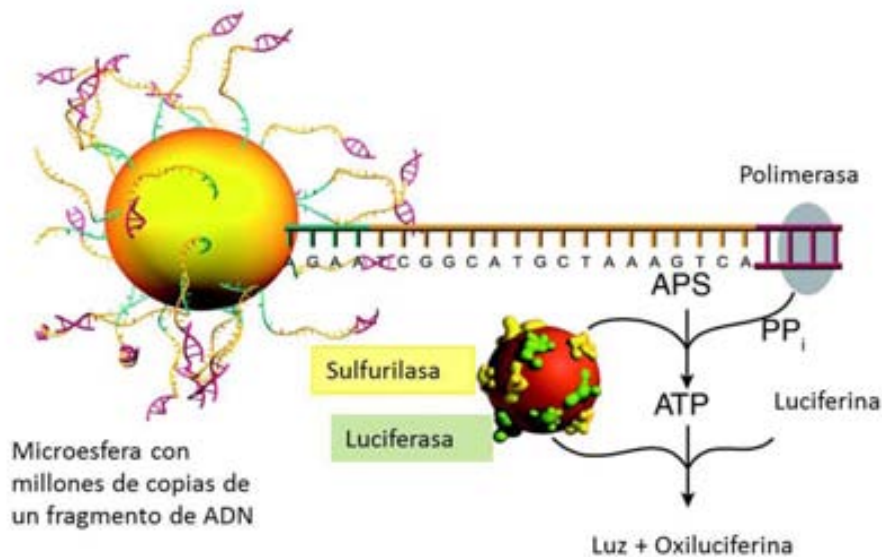


Figura 9. Reacción de pirosecuenciación. El secuenciador introduce los cuatro nucleótidos secuencialmente. La incorporación de un nucleótido por la ADN polimerasa libera pirofosfato inorgánico (PP_i) que se convierte a adenosina trifosfato (ATP) por medio de la sulfurilasa. El ATP producido es consumido por la luciferasa para oxidar la luciferina a oxiluciferina y crear luz. Esta luz es captada por el aparato y transformada en información de la secuencia. Los dNTPs que no se han unido son degradados por el enzima apirasa antes de comenzar el ciclo de nuevo. Adaptado de Mardis ER [93].

Comparado con los otros equipos de secuenciación masiva, el punto fuerte del equipo 454 de ROCHE es la longitud de las secuencias que genera, más de un millón de secuencias de más de 400 bases de longitud en 10 horas. Aunque su coste por base es mayor que en otros equipos, es el más adecuado para ciertas aplicaciones, como los estudios de metagenómica, debido a esta capacidad [95, 96].

2.1.2 ILLUMINA

La secuenciación en Illumina se basa también en el concepto secuenciación por síntesis. El primer paso consiste en una amplificación en medio sólido. Para ello, se parte de una mezcla de fragmentos de ADN de cadena sencilla con unos adaptadores en los extremos. Estos fragmentos se unen a una superficie de cristal mediante hibridación de los adaptadores a los oligonucleótidos complementarios fijados en el cristal. Se produce una amplificación de los fragmentos mediante los cebadores adyacentes, lo que se denomina amplificación en puente, formándose una agrupación de secuencias idénticas (cluster) (figura 10). En el cristal se producen cientos de millones de agrupaciones, y cada uno contiene aproximadamente 1000 copias del mismo ADN molde.

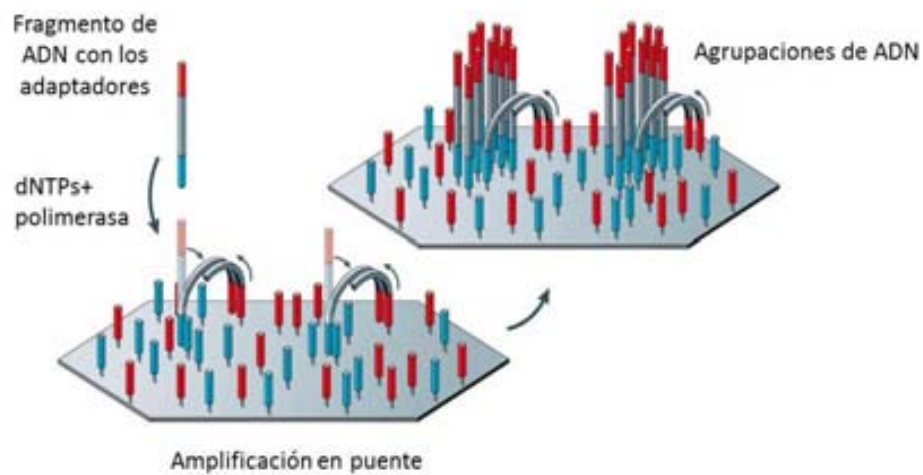


Figura 10. Detalle de la amplificación en puente en la superficie de cristal y creación de las agrupaciones de ADN. Adaptado de Metzker ML [94].

La lámina de cristal se introduce en el aparato y se añade la polimerasa y los cuatro nucleótidos marcados fluorescentemente y cuyos extremos 3'-OH están bloqueados para asegurar que se añade tan solo un nucleótido por ciclo. Cuando se añade un nucleótido, se hace un lavado para eliminar los otros 3 nucleótidos no usados, y se identifica el nucleótido añadido mediante el marcaje fluorescente. Finalmente, se elimina el marcaje fluorescente y se desbloquea el extremo 3' del nucleótido para poder seguir con la incorporación de nucleótidos. El error más común de este equipo son las sustituciones de bases, con una gran proporción de estos errores cuando el nucleótido que se ha añadido previamente es una guanina. Además, se ha detectado una baja representación de regiones ricas en AT y una sobre-representación de regiones ricas en CG en los análisis hechos con Illumina, probablemente por un sesgo producido al preparar el ADN molde [93, 94, 96]. Este sistema actualmente es el que domina el mercado de secuenciadores masivos.

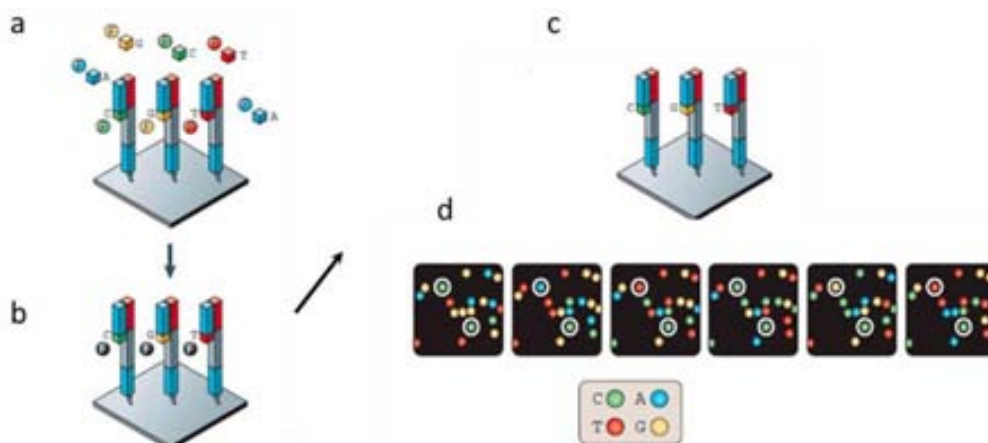


Figura 11. Secuenciación en Illumina. a) y b) se añaden los cuatro nucleótidos con los extremos 3' bloqueados y unidos a un marcador fluorescente, que compiten entre sí para unirse complementariamente a la secuencia. c) Una vez unidos, se recoge la imagen y se elimina el marcador fluorescente y se regenera el extremo 3' para seguir con la secuenciación. d) Imagen que recoge el equipo que se transformará en la información de la secuencia. Adaptado de Metzker ML [94].

2.1.3 LIFE TECHNOLOGIES SOLiD

El proceso de amplificación y creación de la librería es similar al de 454 de Roche. Se unen los fragmentos de ADN a las microesferas mediante un adaptador y se amplifican mediante una PCR de emulsión. El anclaje a las microesferas, a diferencia de 454, se hace en una lámina de cristal. Para la secuenciación se procesan dos láminas a la vez, una de ellas recibe los reactivos de secuenciación y la otra lámina se registra la imagen.

La ligación se genera con cebadores de 8 bases de longitud, con un grupo hidroxilo libre en el extremo 3', un marcador fluorescente en el extremo 5' y un sitio de escisión entre las bases 5 y 6. Las dos primeras bases (empezando por el extremo 3') son complementarias a los nucleótidos de la secuencia de ADN molde. De las bases 3 a la 5 son bases degeneradas capaces de unirse a cualquier nucleótido de la secuencia. Las bases 6, 7 y 8 son también degeneradas y se eliminan, junto con el marcador fluorescente, conforme la secuenciación avanza. Esta separación deja libre el grupo fosfato del extremo 5' para seguir el proceso de ligación. Cada paso de secuenciación está compuesto por 5 series y cada serie consta de 5-7 ciclos. Cada serie comienza con la adición de un cebador universal cuyo extremo 5' es complementario al extremo 3' del adaptador P1 que hay en cada fragmento de ADN. En el primer ciclo se liga una sonda de 8 bases de acuerdo a las dos primeras bases, las sondas que no se han unido se eliminan, se recoge la señal fluorescente emitida y se separan las bases 6,7 y 8 de la sonda. En el siguiente ciclo, se une otra sonda de 8 bases y así sucesivamente hasta que se llega al final del molde. En la siguiente serie, un nuevo cebador universal se une en la posición n-1, con su extremo 5' complementario a la base justamente anterior al extremo 3' del P1, repitiendo los ciclos como en la primera serie. En las 3 series que quedan se usan otros cebadores universales con posiciones de unión n-2, n-3 y n-4, relativas al extremo 3' del cebador P1. Una reacción de 5 series permite la secuenciación de 25 pares de bases del ADN molde desde el adaptador P1.

Para decodificar los datos, que son distintos colores, como cada color indica dos bases, hay que saber una de las bases que se incorpora a la secuencia. Esta base conocida es el último nucleótido del extremo 3' del cebador universal P1. Por tanto, como cada color representa dos nucleótidos, y el segundo nucleótido de cada pareja

se corresponde con el primero de la siguiente, sabiendo el color de uno, se puede interpretar la secuencia entera [93, 94].

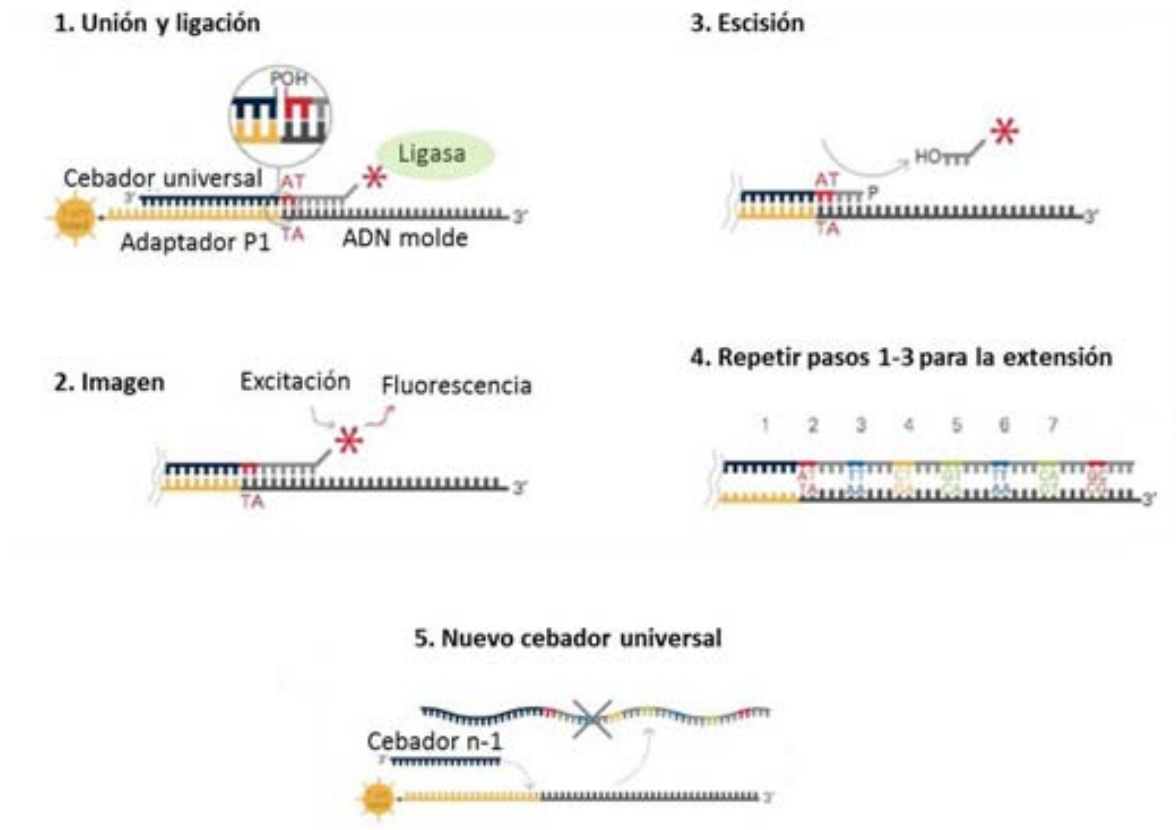


Figura 12. Reacción de secuenciación por ligación. Adaptado de www.seqanswers.com [97].

Este equipo minimiza los errores en los homopolímeros, pero el error dominante es la sustitución de bases. La tasa de error es bastante alta, variando de aproximadamente el 2% en el extremo 5' hasta aproximadamente 8% en el extremo 3' [98].

2.1.4 ION TORRENT (Life Technologies)

Este método se basa también en la secuenciación por síntesis pero, a diferencia de los anteriores, obtiene la señal eléctricamente y no por imagen, lo que abarata los costes, porque no necesita nucleótidos modificados y no requiere un equipo de detección de imagen.

La creación de la librería y amplificación de la muestra es equivalente a la del

equipo 454 de Roche. Tras la PCR de emulsión, las microesferas se depositan en los micropocillos de un chip semiconductor donde se realizará la secuenciación. Durante la secuenciación, el equipo añade los nucleótidos secuencialmente. Cuando uno de ellos es complementario a la hebra molde, se produce la unión mediada por la polimerasa y se libera una molécula de pirofosfato y un protón de hidrógeno. Este protón cambia el pH de la solución, siendo este cambio proporcional al número de nucleótidos que se han unido (0,02 unidades de pH por nucleótido añadido). Este cambio lo detecta un sensor colocado bajo cada pocillo, que lo convierte a voltaje y lo digitaliza. Después de cada adición de nucleótidos, se hace un lavado antes de añadir otro. La detección de la señal se hace mediante un ISFET (transistor de efecto campo sensible a iones, del inglés *Ion Sensitive Fiel Effect Transistor*) colocado debajo de cada micropocillo del chip y conectado con un CMOS (del inglés *Complementary metal-oxide-semiconductor*) similar al que se usa en la industria electrónica [99].

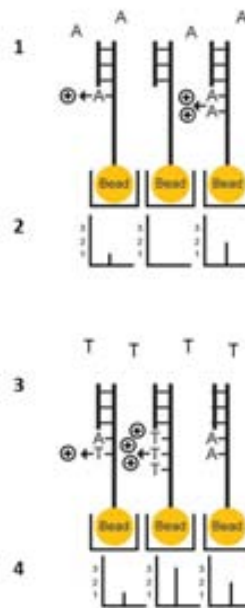


Figura 13. Secuenciación y lectura de la señal en ION TORRENT. Adaptado de www.labome.com [100].

2.1.5 PACIFIC BIOSCIENCIAS RS

Esta técnica de secuenciación se denomina secuenciación en tiempo real de molécula única (SMRT, del inglés *Single Molecule Real Time Sequencing*) debido a que se registra la incorporación de los nucleótidos según se va sintetizando el ADN. Moléculas individuales de ADN se unen a la superficie de un detector ZMW (*Zero-Mode Waveguide detector*) que es capaz de detectar la información de la secuencia mientras los nucleótidos se añaden a la cadena de ADN. En este método, no se realiza una amplificación de la librería.

El detector ZMW reduce el volumen de observación, por tanto reduce el número de moléculas marcadas con fluorescencia que entran en el detector en un momento dado. De esta forma, con el ZMW se puede trabajar con concentraciones de nucleótidos marcados a niveles de pico o nanomolar en lugar de micromolar, que es la concentración adecuada para la ADN polimerasa. Esto permite trabajar con un volumen lo suficientemente pequeño como para observar un único nucleótido uniéndose a la cadena. El ZMW detecta la señal fluorescente de la unión del nucleótido y tras la unión, se libera el marcador que se dispersa fuera del área de detección del ZMW. La secuencia se registra en base a la señal fluorescente emitida.

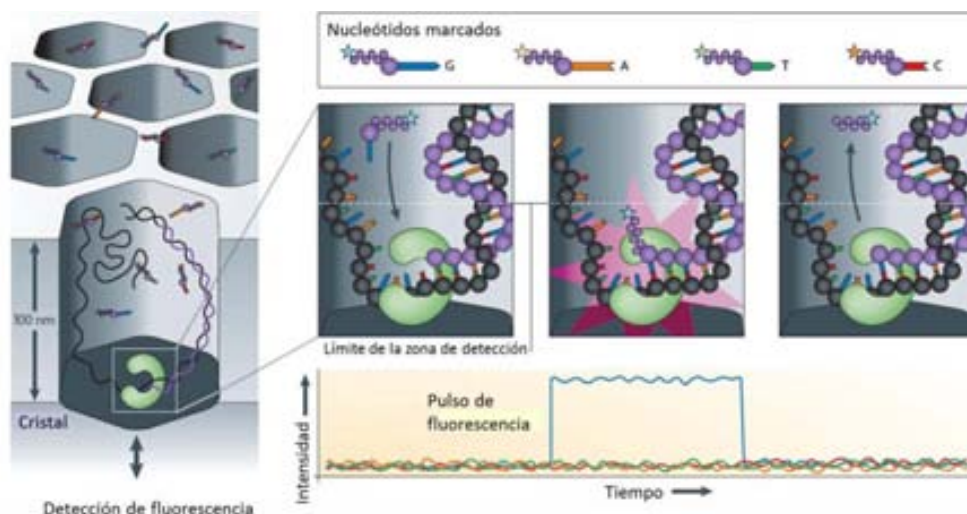


Figura 14. Secuenciación en tiempo real de Pacific Biosciences. Adaptado de Metzker ML [94].

Los experimentos de secuenciación masiva generan grandes volúmenes de datos, lo que ya por sí solo es problemático, debido a la necesidad de infraestructuras de alto rendimiento para almacenarlos y para manejarlos. Además, las técnicas necesarias para analizar los datos pueden ser computacionalmente exigentes. El primer paso en todos los casos es la transformación de los datos emitidos por los equipos en secuencias. Tras esto, las secuencias deben ser filtradas y sometidas a pruebas de calidad para ser posteriormente alineadas. Por último, hay que interpretar el significado biológico y/o médico de todos los datos obtenidos.

Actualmente hay diferentes grupos de herramientas bioinformáticas que se pueden agrupar en cuatro categorías: programas para establecer la secuencia a partir de los datos de imagen (*base calling*), programas de alineamiento frente a una referencia, programas de ensamblaje *de novo* y programas de exploración y detección de variantes en el genoma. Sin embargo, hay bastantes limitaciones en las herramientas analíticas disponibles y aún quedan muchos retos y cuestiones por resolver, debido a que los diferentes equipos de secuenciación producen distintos tipos de datos y por tanto, tienen diferentes requerimientos para el análisis [96].

2.2 METAGENÓMICA Y MICROBIOMA HUMANO

Con la aparición de estas nuevas tecnologías, ha habido un interés creciente en el estudio del ser humano como un súper-organismo formado por las interacciones entre los componentes humanos y microbianos. Además, cada vez parece más clara la importancia que tienen las comunidades microbianas en la biología y en la salud y enfermedades de los humanos.

La metagenómica se refiere al estudio del conjunto de genomas que conforman las comunidades microbianas de un determinado entorno a partir de muestras de ese ambiente directamente, sin necesidad de que los microorganismos sean cultivados y aislados. Para ello, las secuencias obtenidas del ambiente, se comparan con todas las secuencias conocidas para poder identificarlas. Además, como las secuencias obtenidas están aproximadamente en proporción a la frecuencia con que aparecen en la población, se puede inferir la abundancia relativa de cada una.

Los humanos viven en simbiosis con millones de especies microbianas que habitan en las superficies externas e internas de nuestro cuerpo [95]. El microbioma es el ecosistema que engloba todos los microorganismos de un determinado ambiente junto con las interacciones de sus genes con el ambiente. Al grupo de microorganismos se le denomina microbiota, o comunidad microbiana, y puede incluir bacterias, arqueas, virus y hongos. La microbiota humana está formada por todos los microorganismos que existen sobre o dentro del cuerpo humano, incluyendo el tracto gastrointestinal, el tracto genitourinario, la cavidad oral, el tracto nasofaríngeo, el tracto respiratorio y la piel. Las bacterias son los microorganismos mejor estudiados, pero las arqueas, virus y hongos también tienen un papel importante. Se estima que el contenido genómico de las comunidades microbianas de las diferentes partes del cuerpo es 100 veces mayor que el genoma humano. Estas variadas y diversas colecciones de genes codifican una gran selección de funciones bioquímicas y fisiológicas que pueden beneficiar al huésped, así como a los otros microorganismos que hay alrededor [95, 101, 102].

Un factor a tener en cuenta es que el estudio del metagenoma es muy complejo en comparación con el estudio de genomas individuales, debido sobre todo a que hay gran cantidad de lagunas en el conocimiento. Por ejemplo, aproximadamente un 62% de las especies que se ha identificado en el intestino humano no se conocían, y un 80% se consideran no-cultivables. Además, el metagenoma humano puede variar en función de la localización, la edad y factores ambientales como la dieta. Algo que tampoco está claro es si se puede definir una microbiota común humana, ya que en diferentes regiones del cuerpo se pueden encontrar diferentes especies con distintas abundancias.

Con los cultivos tradicionales solo se pueden aislar un pequeño porcentaje de los microorganismos presentes en un determinado ambiente. Las técnicas moleculares ofrecen una alternativa capaz de recoger una información muy detallada de los microorganismos, eludiendo los sesgos de los cultivos.

2.2.1 Gen 16S ARNr

El gen de la subunidad pequeña ribosómica o 16S ARNr es un componente altamente conservado de los ribosomas de procariotas. Los ribosomas son complejos macromoleculares de proteínas y ácidos ribonucleicos encargados de sintetizar las proteínas a partir del ARN mensajero. Los procariotas tienen ribosomas 70S, constituidos por una subunidad grande (50S) y una subunidad pequeña (30S), esta última compuesta por el 16 ARNr y 21 proteínas.

El gen 16S ARNr tiene aproximadamente 1,5 kpb de longitud y contiene 9 regiones variables intercaladas entre regiones conservadas, por lo que le hace un buen marcador capaz de discriminar diferentes microorganismos. La longitud de estas regiones hipervariables varía entre 50 y 100 pb, y difieren en su utilidad para la identificación bacteriana [101–103].

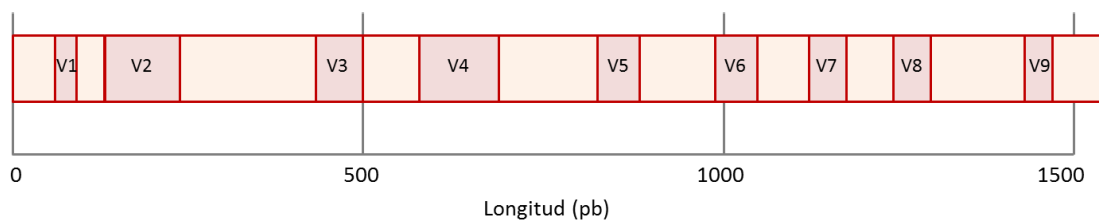


Figura 15. Regiones conservadas e hipervariables (V1-V9) del gen 16S ARNr. Modificado de Cox y cols. [101].

Los métodos de secuenciación basados en el gen 16S ARNr se basan en una amplificación por PCR de un fragmento del gen mediante cebadores universales diseñados para unirse a las regiones conservadas del gen. Posteriormente, se hace una secuenciación en un aparato de secuenciación masiva que permite el estudio de muchas muestras a relativo bajo precio.

Una de las limitaciones principales de la secuenciación del 16S ARNr es el sesgo producido por la PCR, ya que puede favorecer o desfavorecer la amplificación de un determinado tipo de microorganismos. El uso de polimerasas termoestables, así como gradientes de temperatura durante la amplificación, pueden ayudar a aumentar la especificidad de la amplificación antes de la secuenciación [102]. Además, el gen puede aparecer entre 1 y 15 veces en el genoma de las bacterias, lo que puede

influenciar los resultados de abundancia relativa de un determinado microorganismo [101].

El análisis del gen 16S ARNr se basa en la agrupación de secuencias a un determinado nivel de identidad y en el conteo del número de representantes en cada agrupación. Debido a que durante la secuenciación se puede producir algún error, exigir un 100% de identidad entre las secuencias sería excesivamente conservador, ya que trataría a genomas iguales como diferentes microorganismos. Por eso, se acepta un grado de divergencia, 95 %, 97% o 99% normalmente, y a la agrupación de secuencias se les denominan unidades taxonómicas operacionales (OTUs).

La precisión de la identificación depende de la base de datos de referencia que se elija. Actualmente existen tres bases de datos controladas y verificadas con las secuencias del 16S ARNr, The Ribosomal Database Project [104], GreenGenes [105] y SILVA [106], en las que las secuencias se pueden alinear y obtener una buena identificación. De este modo, se puede describir la comunidad bacteriana en términos de qué OTUs están presentes y su abundancia relativa. Además, hay dos programas bioinformáticos que se pueden usar para analizar este tipo de datos, QIIME [107] y Mothur [108], aunque no hay ningún método estandarizado que describa como aplicar estos programas a los datos.

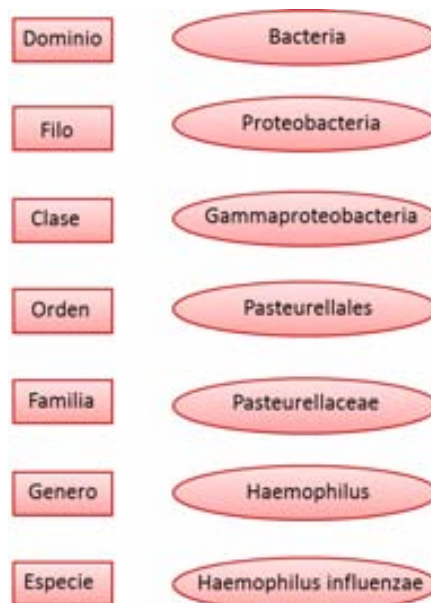


Figura 16. Clasificación taxonómica en bacteria usando *H. influenzae* como ejemplo.

2.2.2 Análisis de la comunidad microbiana

Aunque la identificación de los microorganismos presentes es ya de por sí un objetivo, conocer cómo se estructura la comunidad mediante índices que miden la riqueza de especies, su uniformidad y la diversidad, es también importante y está relacionado con la salud. Varias enfermedades en humanos se han relacionado con una disminución en la diversidad de la microbiota, como por ejemplo, la fibrosis quística y la enfermedad inflamatoria intestinal [109].

Para medir la diversidad de la población existen diferentes parámetros. Algunos de los términos importantes son:

- Diversidad: número de diferentes entidades que conforman la comunidad. Tiene en cuenta la abundancia y la uniformidad de la población.
- Riqueza: número de especies distintas presentes.
- Uniformidad: medida del sesgo en la abundancia de los miembros de la comunidad, determinando si hay un organismo dominante o estos están uniformemente representados.
- Alfa-diversidad: diversidad dentro de una muestra.
- Beta-diversidad: diversidad entre diferentes muestras. Representa la similitud o diferencia en la composición de organismos entre muestras.
- Índice de Shannon, Chao1, Simpson: son parámetros que miden la α -diversidad de una muestra. A partir de estos valores, se pueden crear las curvas de rarefacción, que representan la relación entre el número de secuencias recogidas de una muestra y el número de taxones diferentes presentes, en base a las abundancias detectadas.
- Índice de disimilitud de Bray-Curtis: es una medida que permite estimar la β -diversidad. El valor está comprendido entre 0 y 1, donde 0 significa que las muestras tienen la misma composición y 1 que son completamente diferentes. A partir de este índice, se pueden realizar análisis de coordenadas principales (PCoA), que permiten extraer y visualizar los componentes de variación más informativos de un grupo de datos complejo y multidimensional. Así, se hace una transformación de los datos presentes en una matriz de distancias a unos nuevos ejes ortogonales de forma que la primera coordenada explica el mayor porcentaje de variación y así sucesivamente (figura 17).

La microbiota representa un componente clave en la medicina personalizada del futuro, en primer lugar porque se ha asociado un gran número de enfermedades con la función de la microbiota, como la obesidad, la diabetes, la depresión, la fibromialgia, el autismo y la alergia [110]. La microbiota además es extraordinariamente plástica, puede cambiar su metagenoma en horas y su metatranscriptoma en minutos en respuesta a perturbaciones como la toma de antibióticos o la variación en la dieta, lo que abre la posibilidad a nuevos tratamientos [101, 103].

Los millones de microorganismos que viven en nuestro cuerpo explican una proporción de nuestro metabolismo y señalización al menos tan grande como otras partes esenciales del cuerpo, y no ha sido hasta estos últimos años cuando se ha empezado a conocer su importancia. El reto consiste en establecer las relaciones entre la microbiota y el huésped humano en las diferentes partes del cuerpo, y como varían estas relaciones en el caso de enfermedad, con la finalidad de ser capaces de trasladar este conocimiento a un beneficio clínico [101, 103].

2.3 MICROBIOMA EN EPOC

Históricamente las vías respiratorias inferiores y los pulmones se han considerado estériles. Sin embargo, ningún estudio llevado a cabo con las nuevas técnicas moleculares de detección microbiológica ha podido demostrar esta esterilidad. Varios estudios han demostrado que en las vías respiratorias inferiores hay una comunidad bacteriana diversa, tanto durante periodos de salud como durante enfermedad. Por tanto, el estudio del microbioma pulmonar puede revelar nuevos conocimientos sobre la patogénesis de la infección pulmonar y de otras enfermedades pulmonares que antes se pensaba que estaban indirectamente relacionadas con la microbiota [111].

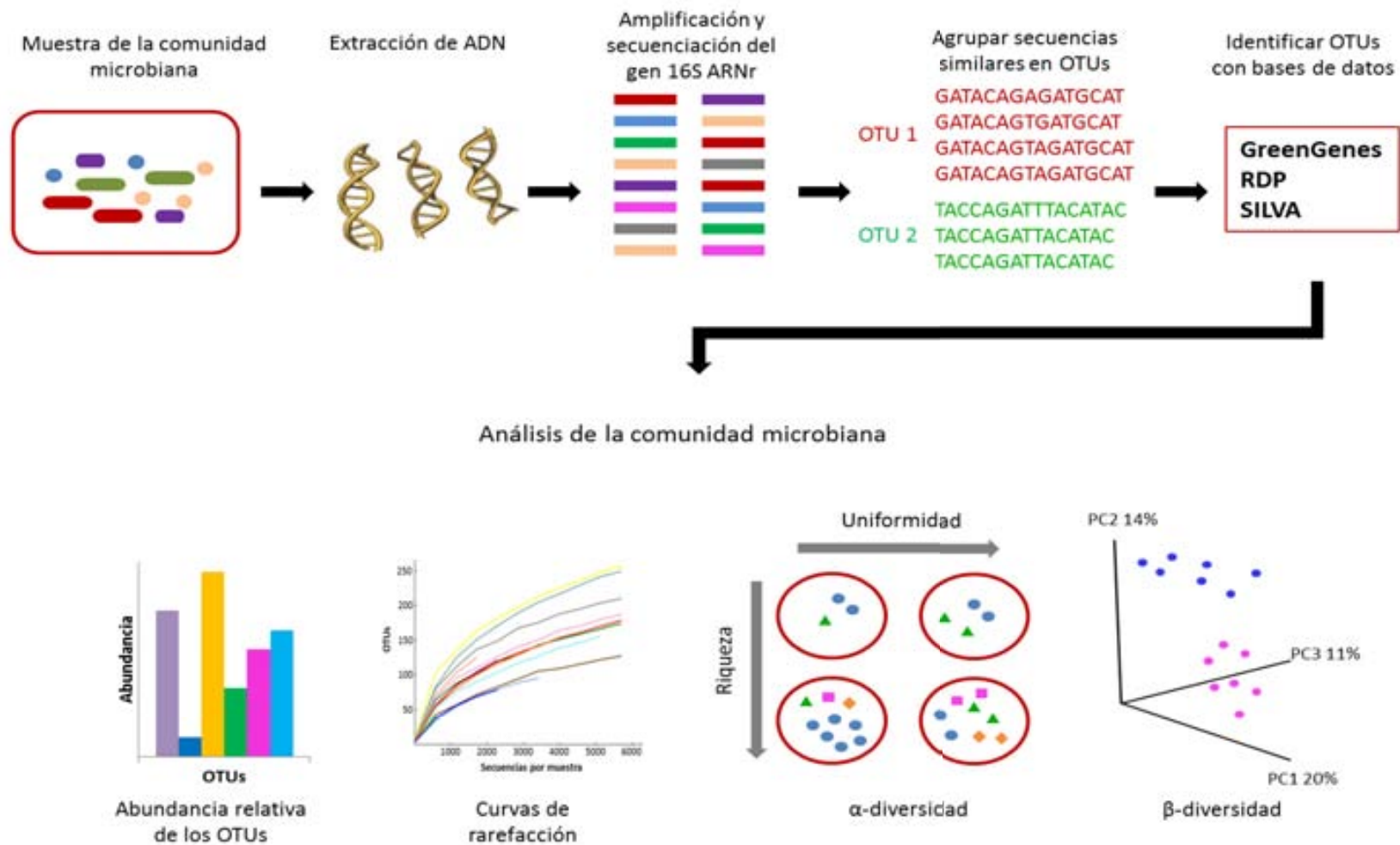


Figura 17. Flujo de trabajo en los estudios de la microbiota basados en la secuenciación del gen 16S ARNr. Modificado de Morgan y cols. [103].

En los estudios en los que se ha analizado la microbiota pulmonar de individuos sanos [112–117], los filos bacterianos con mayor abundancia relativa que se han encontrado han sido *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Además, estos resultados, que se obtuvieron en muestras de BAL, concuerdan con estudios en los que las muestras analizadas provenían de las vías respiratorias superiores (orofaríngeas o nasales), aunque con diferentes abundancias relativas. Los géneros bacterianos más prevalentes fueron *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus* y *Pseudomonas*.

El hábito tabáquico parece que altera la comunidad microbiana de las vías respiratorias superiores, pero no se conoce el efecto que tiene en la microbiota pulmonar. Y tampoco se sabe si la microbiota pulmonar normal está influenciada por la zona geográfica donde se habite, a diferencia de la microbiota intestinal normal, en la que se ha demostrado grandes diferencias geográficas [111, 118].

En la EPOC, a pesar de años de investigación de la relación entre la colonización/infección y la inflamación y destrucción de las vías aéreas, aún no se ha llegado a un acuerdo en cuanto a su efecto. Durante los últimos años, se han llevado a cabo diferentes estudios que han analizado la microbiota pulmonar de los pacientes con EPOC. La mayoría de estos estudios se realizaron sobre muestras de BAL y con pacientes que no presentaban signos de infección respiratoria y no habían tomado antibióticos recientemente. La principal conclusión de estos estudios es que la microbiota de las vías respiratorias inferiores de los pacientes con EPOC es diferente de la de los individuos sanos, lo que puede ser relevante tanto para el progreso de la enfermedad como para la aparición de exacerbaciones de naturaleza infecciosa.

De los trabajos que analizan la microbiota de los pacientes con EPOC publicados hasta el momento, Hilty y cols. [115] compararon muestras de individuos sanos con muestras de pacientes con EPOC y asma. Encontraron que la microbiota de los pacientes con EPOC era más parecida a la de los pacientes con asma que a la de los individuos sanos, y presentaban un aumento en la abundancia de *Proteobacteria* y una disminución de *Bacteroidetes*. Además, los pacientes con EPOC tenían una abundancia mayor de *Haemophilus spp.* comparados con los individuos sanos.

Otro trabajo comparó la microbiota de pacientes con EPOC severa y la de controles fumadores y no fumadores en muestras de BAL y tejido pulmonar [112]. En el análisis del BAL, se observó que los tres grupos tenían similar abundancia

bacteriana, pero en los pacientes con EPOC la diversidad de la comunidad bacteriana era menor. Los géneros presentes en los pacientes con EPOC fueron, entre otros, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* y *Haemophilus*. Sin embargo, en otro estudio en el que también se usaron muestras de BAL [116], se encontró mayor diversidad en las muestras de los pacientes con EPOC que en los controles, estando además la diversidad positivamente correlacionada con la severidad de la enfermedad. La complejidad de la interpretación de los resultados obtenidos en estos pacientes se incrementa por la observación en un estudio sobre muestras tisulares de una marcada heterogeneidad espacial de la microbiota en el pulmón de los pacientes más severos [112]. Otro trabajo encontró la misma abundancia y diversidad microbiana en pacientes con EPOC e individuos sanos en muestras de tejido pulmonar, aunque la microbiota en los pacientes con EPOC era diferente a la de los controles, con niveles más elevados de *Firmicutes* [117].

En la comparación de diferentes muestras de secreciones respiratorias se ha observado que la microbiota encontrada en el BAL y en biopsias bronquiales era similar y más diversa que la presente en el esputo [119]. Los filos bacterianos encontrados fueron similares a los descritos por estudios previos, con presencia mayoritaria de *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, y a nivel de género, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium* y *Neisseria*.

Únicamente un estudio ha analizado muestras de pacientes con EPOC tras una exacerbación y, a pesar de que los pacientes habían tomado antibióticos antes de la recogida de las muestras, se encontró una gran diversidad microbiana [120].

Así, los resultados actualmente disponibles, equivalentes en algunos casos, pero contradictorios en muchos otros, ponen de manifiesto la necesidad de más estudios para establecer la implicación de la microbiota en el desarrollo de la EPOC.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Hasta hace pocos años se consideraba que la vía respiratoria de los individuos sanos era estéril, pero que en los pacientes con EPOC esta vía aérea estaba colonizada por MPPs. Hoy en día, gracias a las nuevas técnicas microbiológicas independientes de cultivo, se sabe que la vía respiratoria inferior tiene una microbiota diversa y característica.

La colonización de la vía respiratoria por MPPs en los pacientes con EPOC es así un hecho conocido, y el efecto de estos microorganismos como agente causal de exacerbación está también ampliamente descrito. Sin embargo, los efectos que provoca la colonización bacteriana en los periodos de estabilidad aún no se han dilucidado, aunque se conoce la asociación entre colonización e inflamación bronquial.

La presencia de MPPs en estabilidad en la vía aérea puede estar relacionada con defectos en el sistema inmunitario del paciente y estar facilitada por la destrucción epitelial característica de la enfermedad. Además, la presencia de estos MPPs puede determinar una alteración de la microbiota bronquial asociada y, por esta vía, tener también un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

1. Determinar la relación entre la colonización bronquial por *H. influenzae* en pacientes con EPOC estable y la respuesta inmunitaria de la mucosa bronquial.
2. Evaluar el efecto de la colonización bronquial por *H. influenzae* en los niveles de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9) y su inhibidor, inhibidor tisular de metaloproteínasa 1 (TIMP-1), proteínas relacionadas con el remodelado bronquial.
3. Caracterizar el microbioma bronquial de los pacientes con EPOC severa estable colonizados o no colonizados por *P. aeruginosa* y sus cambios cuando aparece una exacerbación.
4. Establecer los cambios en el microbioma bronquial asociados a la progresión de la EPOC.

RESULTADOS

1. EFECTO DE LA COLONIZACIÓN BRONQUIAL POR *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* EN LA RESPUESTA INMUNE LOCAL Y LA ACTIVIDAD DE LAS METALOPROTEINASAS EN PACIENTES CON EPOC ESTABLE.

1.1 Resumen

Haemophilus influenzae es la bacteria que más frecuentemente aparece colonizando la vía respiratoria de los pacientes con EPOC. La detección de este microorganismo por cultivo se ha asociado con inflamación bronquial, lo que sugiere la existencia de una relación directa entre la mucosa bronquial y esta bacteria.

En este estudio se analizaron pacientes con EPOC moderada colonizados o no colonizados por *H. influenzae*. Los pacientes formaron parte de la cohorte Phenotype and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (PAC-EPOC), en la que participaron 9 hospitales universitarios de España. Se detectaron los niveles de IgA específica contra este microorganismo en el sobrenadante de esputo mediante Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). Asimismo, se determinaron los niveles de la proforma y la forma activa de MMP-9 y de su inhibidor TIMP-1, también mediante ELISA.

En el estudio de la IgA específica contra *H. influenzae* se analizaron 54 pacientes, 33 de ellos no colonizados y 21 colonizados por *H. influenzae*. Se detectaron niveles significativamente más bajos de IgA ($p=0,033$) en los pacientes colonizados (15 [4-37]) que en los no colonizados (31 [10-75]).

En cuanto al estudio de la MMP-9 y su inhibidor TIMP-1 se realizó con 44 pacientes, 32 no colonizados y 12 colonizados. Se encontraron concentraciones significativamente más elevadas de la proforma de MMP-9 ($p<0,001$) en los pacientes colonizados (1903 [1488-6699] ng/ml) que en los pacientes no colonizados (639 [373-972] ng/ml). Los niveles de la forma activa de MMP-9 fueron también significativamente mayores ($p=0,021$) en los pacientes colonizados (126 [25-277]ng/ml) que en los no colonizados (39 [14-68] ng/ml). Además, el ratio molar entre la proforma MMP-9 y el inhibidor TIMP-1 estuvo por encima de 1 y fue significativamente mayor ($p=0,030$) en los pacientes colonizados (2,1 [0.1-12,5]) que en los no colonizados (0,2 [0,08-0,5]).

Como conclusión de este primer subestudio se puede afirmar que los pacientes con EPOC en estabilidad colonizados por *H. influenzae* tienen niveles más bajos de IgA específica contra este microorganismo y concentraciones más altas de la forma activa de MMP-9 en el sobrenadante de esputo que los pacientes no colonizados. Por tanto, la colonización bronquial por este microorganismo podría estar favorecida por una respuesta inmune defectuosa y causar cambios estructurales en la matriz extracelular debido a la producción de metaloproteinasas.

1.2 Resultados

1.2.1 Características de los pacientes

Tabla 1. Características clínicas, funcionales y de inflamación de los pacientes con muestras de esputo representativas (n=133).

Características del paciente	
Edad (años), media (DE)	70 (9)
Hombres, n (%)	124 (93)
Paquetes-año, mediana (IQR)	67 (43-102)
Fumadores, n (%)	35 (27)
Exacerbaciones año anterior ≥ 1 , n (%)	45 (34)
FEV ₁ post-BD % pred, media (DE)	52 (16)
Características del esputo	
Neutrófilos/ml $\times 10^6$, mediana (IQR)	6,4 (1,7-17,1)
Neutrófilos %, mediana (IQR)	72 (48-84)
IL-1 β (pg/ml), mediana (IQR)	209 (52-695)
IL-6 (pg/ml), mediana (IQR)	124 (54-259)
IL-8 ($\times 10^3$) (pg/ml), mediana (IQR)	11 (4-16)
Colonizados por MPPs, n (%)	39 (29,3)
Colonizados por <i>H. influenzae</i> , n (%)	22 (17)
Carga bacteriana de <i>H. influenzae</i> $\times 10^6$ (ufc/ml), mediana (IQR)	5,4 (1-12)

En la cohorte PAC-EPOC se incluyeron 342 pacientes, de los cuales 133 tenían muestras de esputo representativas, es decir, tenían una baja proporción de células escamosas (2 [0,5-6]) y alta viabilidad celular (79 [64-90]). Las características de estos pacientes se representan en esta tabla como descriptiva general de la población de estudio. La mayoría fueron hombres (93%), con una edad media de 70 (9) años y un moderado deterioro de la función respiratoria, FEV₁ post-BD % de la referencia 52 (16). En 39 de estos pacientes (29%) se recuperaron MPPs de los cultivos de esputo, siendo en 22 pacientes (17%) *H. influenzae* la bacteria aislada.

Tabla 2. Características de los pacientes y de los marcadores de inflamación en esputo de acuerdo con la colonización por *H. influenzae*.

	No colonizados	Colonizados por <i>H.influenzae</i>	p valor
	n=94	n=22	-
Características de los pacientes			
Edad (años), media (DE)	69 (9)	70 (8)	0,880
Fumador, n (%)	24 (26)	6 (27)	0,932
Paquetes-año, mediana (IQR)	58 (36-90)	103 (60-138)	0,002
FEV ₁ post-BD % pred, media (DE)	52 (16)	50 (15)	0,597
Corticoesteroides inhalados, n (%)	11 (12)	2 (9)	0,727
Mediadores de inflamación en esputo			
Células totales/ml x 10 ⁶ , mediana (IQR)	12 (4-24)	7 (4-22)	0,388
Neutrófilos/ml x10 ⁶ , mediana (IQR)	7 (2-18)	4 (1-14)	0,526
IL-1β (pg/ml), mediana (IQR)	154 (41-485)	746 (121-1802)	<0,001
IL-6 (pg/ml), mediana (IQR)	109 (50-201)	168 (53-436)	0,172
IL-8 (x10 ³) (pg/ml), mediana (IQR)	8 (3-15)	16 (11-22)	< 0,001

En esta tabla se comparan las características de los pacientes y de los marcadores de inflamación del esputo de los pacientes colonizados por *H. influenzae* y los no colonizados. En cuanto a las características clínicas, la única diferencia que se

encontró fue que los pacientes colonizados presentaron un mayor consumo de tabaco acumulado (103 [60-138]) que los pacientes no colonizados (58 [63-90]) ($p=0,002$). Se encontró un patrón de inflamación neutrofílica similar en los dos grupos de pacientes, pero los colonizados por *H. influenzae* tenían niveles significativamente más elevados de IL-1 β (746 [121-1802] vs 154 [41-485]) y de IL-8 (16 [11-22] vs 8 [3-15] ($\times 10^3$)) que en los pacientes no colonizados ($p < 0,001$).

1.2.2 IgA específica contra *H. influenzae*

Se determinaron los niveles de IgA contra antígenos presentes en la superficie celular de *H. influenzae*, en el sobrenadante de esputo de los pacientes colonizados y no colonizados. Se usaron 9 controles sanos para determinar los valores de referencia y los resultados se expresaron como un ratio entre la densidad óptica entre los pacientes respecto a los controles sanos.

Los niveles de IgA fueron significativamente menores ($p=0,033$) en los pacientes colonizados (15 [4-37]) que en los pacientes no colonizados (31 [10-75]) (figura 1).

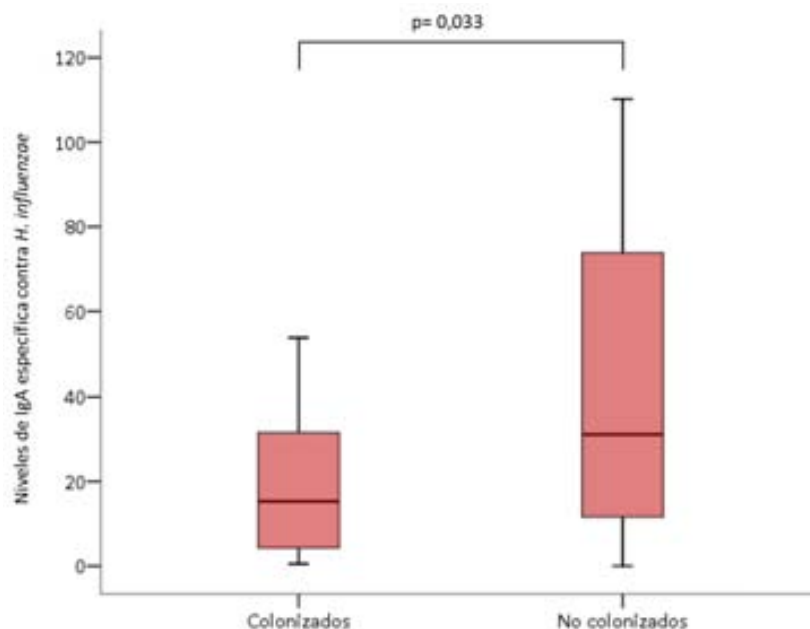


Figura 1. Niveles de IgA específica contra *H. influenzae* en los pacientes colonizados (n=21) y no colonizados (n=33).

1.2.3 Actividad de las metaloproteinasas

La concentración de la proforma de MMP-9 fue significativamente mayor en los pacientes colonizados (1903 ng/ml [1488-6699]) que en los pacientes no colonizados (639 ng/ml [373-972]) ($p < 0,001$) (figura 2) y no se encontraron diferencias en los niveles de TIMP-1 entre los grupos (figura 3). Además, los niveles de MMP-9 activa fueron también significativamente mayores en los pacientes colonizados (126 ng/ml [25-277]) que en los no colonizados (39 ng/ml [14-68]) ($p = 0,021$) (figura 4).

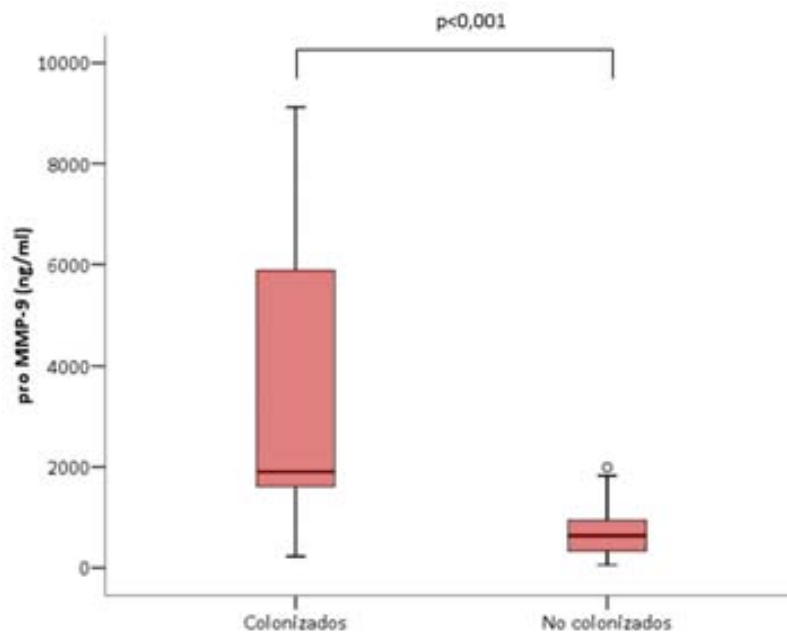


Figura 2. Concentración de la proforma de MMP-9 en los pacientes colonizados (n=12) y en los no colonizados (n=32).

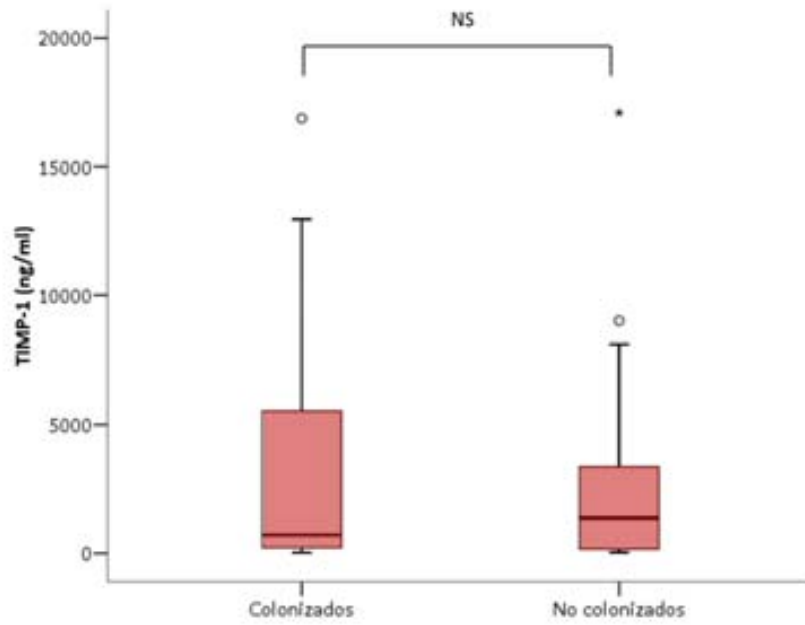


Figura 3. Concentración de TIMP-1 en los pacientes colonizados (n=12) y los no colonizados (n=32).

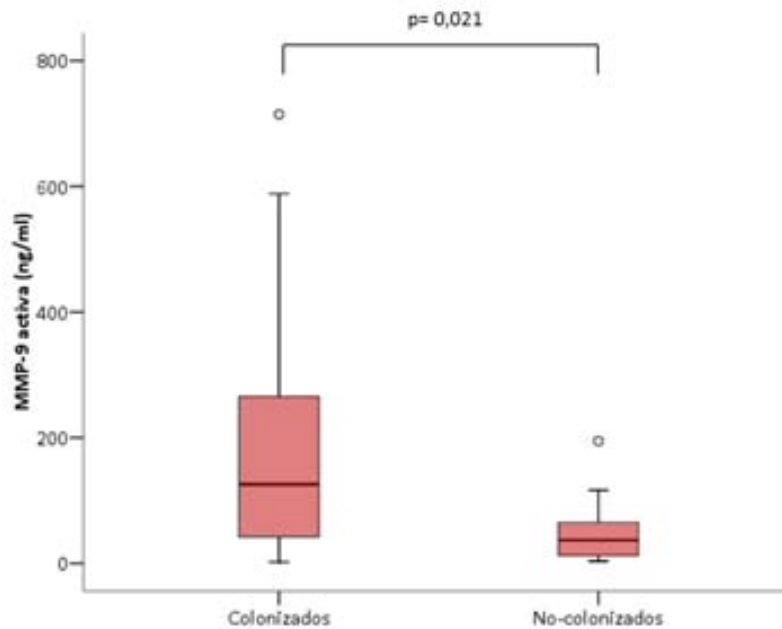


Figura 4. Concentración de MMP-9 activa en los pacientes colonizados (n=12) y no colonizados (n=32).

Se calculó en ratio molar entre los niveles de la proforma de MMP-9 y el TIMP-1, ya que una molécula de TIMP-1 inhibe una molécula de MMP-9. Este ratio estaba por encima de 1 y fue significativamente mayor en los pacientes colonizados (2,1 [0,1-12,5]) que en los pacientes no colonizados (0,2 [0,08-0,5]) ($p=0,030$) (figura 5).

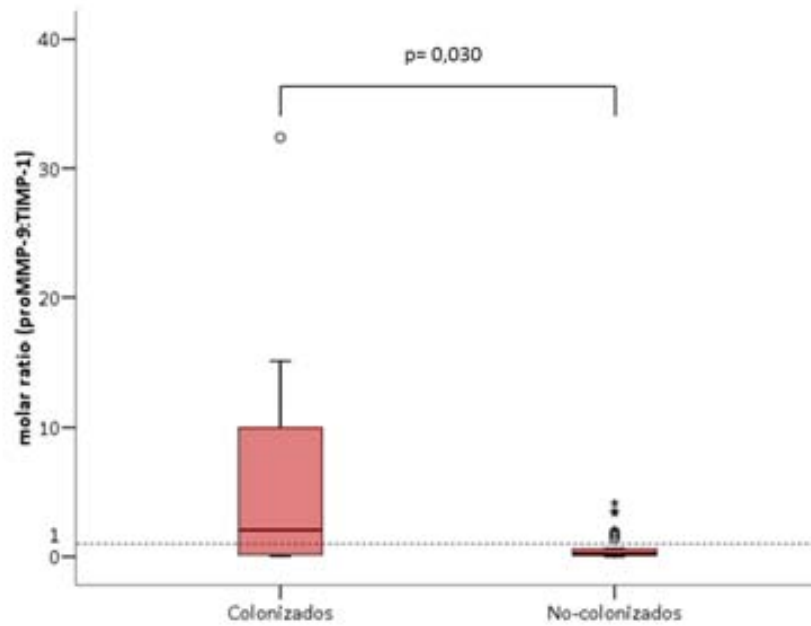


Figura 5. Ratio molar entre la proforma de MMP-9 y TIMP-1 en los pacientes colonizados (n=12) y en los no colonizados (n=32).

2. MICROBIOMA BRONQUIAL DE LOS PACIENTES CON EPOC SEVERA COLONIZADOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

2.1 Resumen

El microbioma bronquial de los pacientes con EPOC severa no se ha definido, ni en periodos de estabilidad ni durante las exacerbaciones. Además, no se sabe qué efecto tiene en el microbioma la colonización por *Pseudomonas aeruginosa*. El objetivo de este trabajo fue determinar las características del microbioma bronquial de los pacientes con EPOC severa colonizados y no colonizados por *P. aeruginosa* y su cambio durante las exacerbaciones.

En el estudio se incluyeron pacientes con EPOC severa y exacerbadores frecuentes (≥ 2 exacerbaciones/año) colonizados y no colonizados por *P. aeruginosa*. Se utilizó como criterio de colonización haber tenido tres o más cultivos positivos para esta bacteria en un periodo de 6 meses previo a la inclusión en el estudio. Se obtuvieron muestras espontáneas de esputo en estabilidad y exacerbación, antes de la administración de antibiótico en el último caso. Se realizaron cultivos tradicionales y amplificación y pirosecuenciación del gen 16S ARNr para el estudio del microbioma. La diversidad bacteriana se estimó mediante los índices Chao1 y Shannon y el índice de disimilaridad de Bray-Curtis se usó para el análisis de coordenadas principales. Además, se calculó la variabilidad de la flora entre estabilidad y exacerbación usando como valor de referencia la variabilidad entre dos muestras consecutivas de estabilidad.

Se incluyeron 16 pacientes en el estudio, 5 de ellos con colonización crónica por *P. aeruginosa*. Se detectaron niveles significativamente más elevados del género *Pseudomonas* en los pacientes colonizados en estabilidad ($p= 0,019$), que también tuvieron una mayor presencia de *Corynebacterium* y *Moraxella*. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los índices de α -diversidad Chao1 y Shannon entre los pacientes colonizados y no colonizados (Shannon, 3 [2-4] vs 3 [2-3], $p=0,699$; Chao1, 124 [77-159] vs 140 [115-163], $p=0,364$). El análisis de coordenadas principales mostró que las muestras de exacerbación de los pacientes colonizados y no colonizados no se separaron en dos grupos, a diferencia de lo que se encontró en estabilidad. Cuando comparamos la variabilidad de la flora en 13 pacientes con muestras apareadas de

estabilidad y exacerbación, encontramos que hubo un incremento en la abundancia relativa por encima del 20% de los géneros *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Achromobacter* y *Corynebacterium*, que incluyen microorganismos potencialmente patógenos relacionados con EPOC. Estos cambios fueron independientes de la colonización por *P. aeruginosa*, y en 5 pacientes (38,5%) no se detectaron por cultivo.

De este segundo subestudio podemos concluir que los pacientes con EPOC estable severa colonizados por *P. aeruginosa* tuvieron una diversidad microbiana similar a los pacientes no colonizados, con una mayor abundancia relativa del género *Pseudomonas* en las secreciones bronquiales. Las exacerbaciones en los pacientes con EPOC severa mostraron el mismo patrón microbiano, que fue independiente de la colonización previa por *P. aeruginosa*.

2.2 Resultados

2.2.1 Características de los pacientes

Se incluyeron en el estudio 16 pacientes con EPOC severa, 6 de ellos en estadio GOLD III (37,5%) y 10 en estadio GOLD IV (62,5%). Todos ellos fueron hombres con una edad media de 71 (DE 6) años y exfumadores. Tenían una función pulmonar muy deteriorada y todos tomaban tratamientos inhalados. Cinco de ellos cumplían el criterio de colonización crónica por *P. aeruginosa*, y los pacientes se dividieron en dos grupos de acuerdo a esta colonización.

Tabla 1. Características de los pacientes.

Pacientes (n)	Total (16)	Colonizados (5)	No colonizados (11)
Edad (años), media (DE)	71 (6)	72 (7)	70,5 (6)
Hombres, n (%)	16 (100)	5 (100)	11 (100)
Tabaquismo (paquetes-año), mediana (IQR)	57 (57-100)	100 (50-110)	50 (40-80)
FEV ₁ post-BD (% pred), media (DE)	36 (30-40)	41 (30-48)	34 (30-37)
Disnea, media (DE)	2,25 (0,6)	2,2 (0,4)	2,3 (0,6)
IMC (kg/m ²), media (DE)	28 (4)	28 (4)	28 (4)
6MM (m), mediana (IQR)	240 (140-305)	300 (220-310)	230 (115-292)
Índice BODE, mediana (IQR)	5 (4,5-7,5)	5 (4-5)	6 (5-8)
β2-adrenérgicos inhalados, n (%)	16 (100)	5 (100)	11 (100)
Anticolinérgicos inhalados, n (%)	16 (100)	5 (100)	11 (100)
Corticosteroides inhalados, n (%)	16 (100)	5 (100)	11 (100)
Cultivos positivos para MPPs, n (%)	12 (86)	5 (100)	7 (64)
Colonización crónica por <i>P. aeruginosa</i> , n (%)	5 (31)	5 (100)	0

2.2.2 Características microbiológicas de las muestras

Catorce muestras de estabilidad y quince de exacerbación fueron adecuadas para el cultivo microbiológico. De éstas, 12 muestras de estabilidad (86%) y 10 de exacerbación (67%) fueron positivas para MPPs, siendo *P. aeruginosa* y *H. influenzae* los microorganismos más frecuentemente aislados.

Tabla 2. Resultados microbiológicos de los esputos en estabilidad y exacerbación.

	Estabilidad	Exacerbación
N	14	15
Cultivos positivos para MPPs, n (%)	12 (86)	10 (67)
Cultivos polimicrobianos, n (%)	4 (29)	3 (20)
Microorganismos		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 (42)	3 (30)
<i>Haemophilus influenzae</i>	4 (33)	4 (40)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2 (17)	1 (10)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2 (17)	1 (10)
<i>Escherichia coli</i>	1 (8)	-
<i>Alcaligenes spp.</i>	1 (8)	1 (10)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	1 (10)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	-	1 (10)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	1 (10)

2.2.3 Microbioma pulmonar

Se analizaron 14 muestras de estabilidad y 15 muestras de exacerbación mediante amplificación y pirosecuenciación del gen 16S ARNr. Después de filtrarlas se obtuvo como media 4695 secuencias por muestra. A nivel de filo, *Proteobacteria* (50%) y *Firmicutes* (31%) fueron los más prevalentes, seguidos de *Actinobacteria* (8%), *Bacteroidetes* (6%) y *Fusobacteria* (3%). *Tenericutes*, *Spirochetas*, *SR1* y *TNM* presentaron una prevalencia por debajo del 0,5%.

A nivel de género se encontraron 128 OTUs diferentes (figura 1), de los cuales se eliminaron los que aparecieron en una sola muestra para los siguientes análisis.

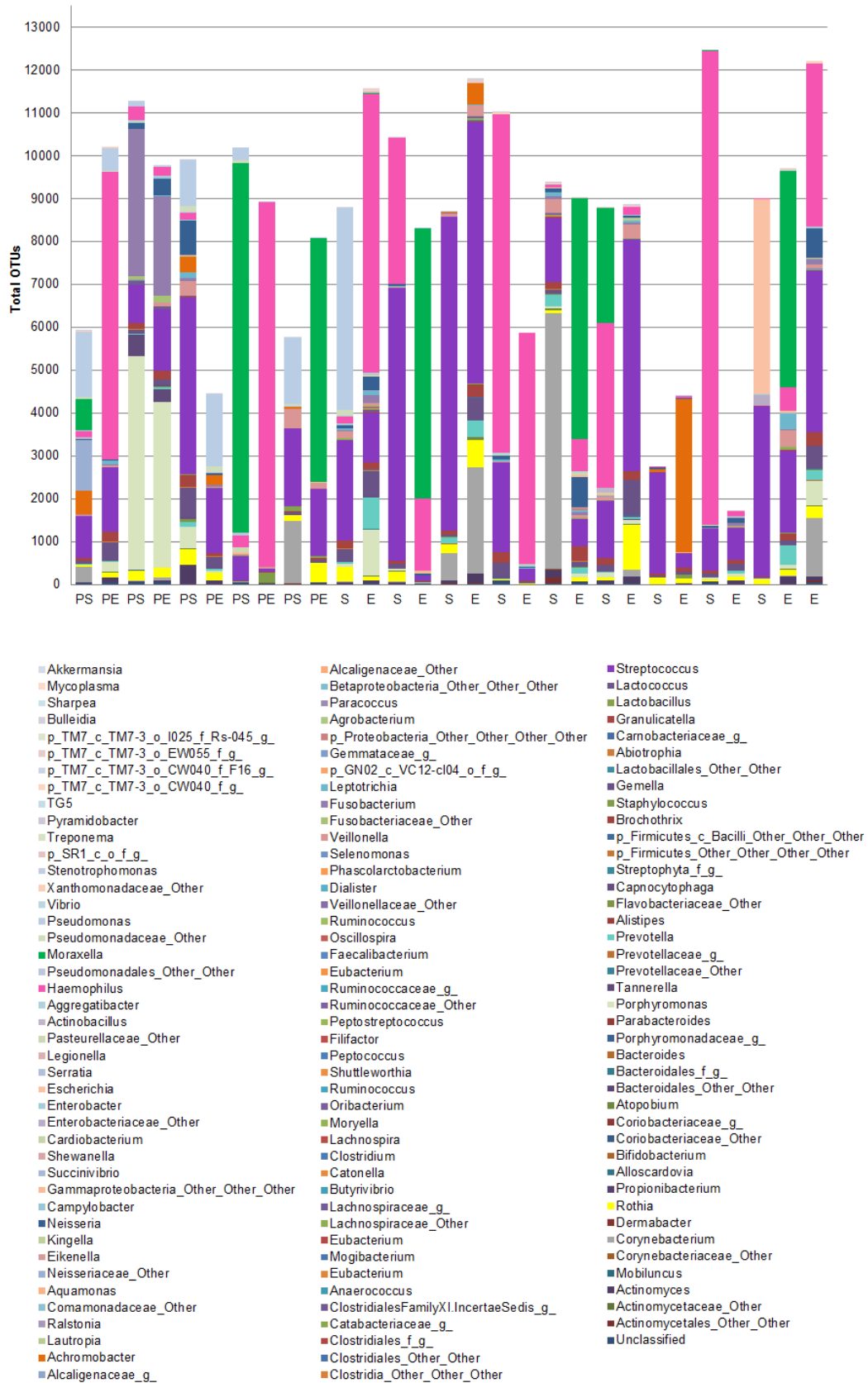


Figura 1. Abundancia de los OTUs detectados a nivel de género en las muestras. PS, pacientes colonizados en estabilidad; PE, paciente colonizado en exacerbación; S paciente no colonizado estable; PE paciente no colonizado en exacerbación.

En cuanto a las abundancias relativas de los géneros detectados solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el género *Pseudomonas*, que tuvo mayor abundancia tanto en estabilidad como en exacerbación en los pacientes colonizados.

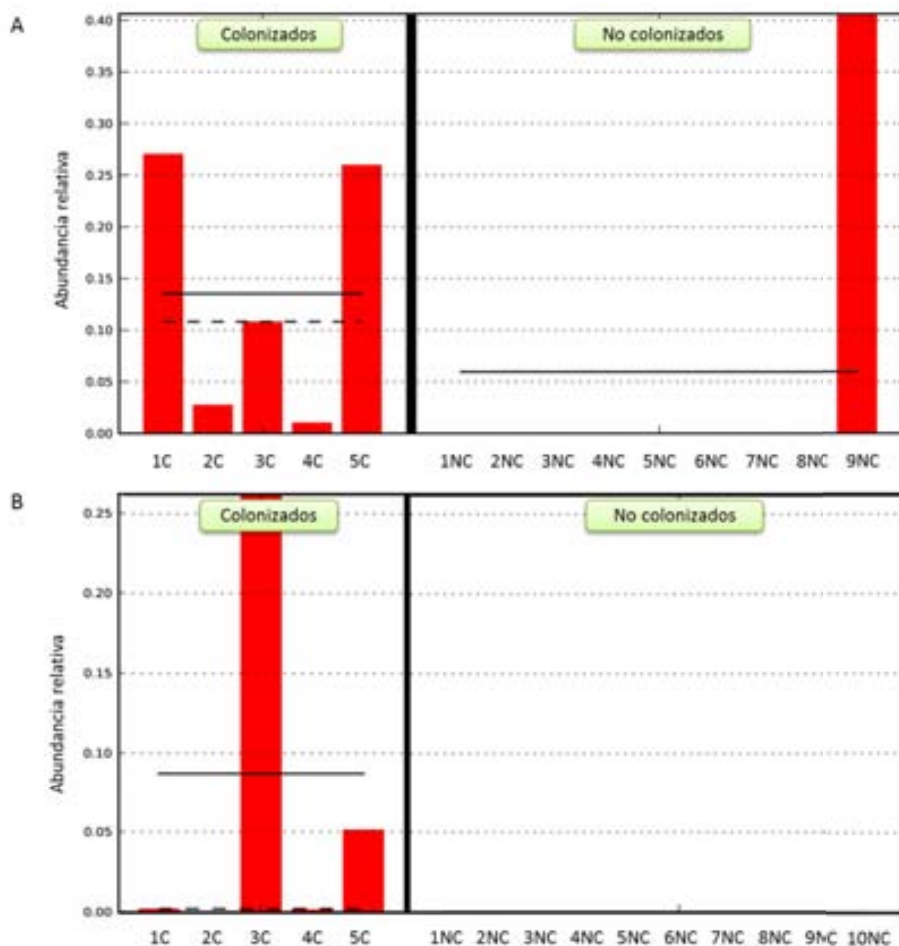


Figura 2. Abundancia relativa del género *Pseudomonas* en estabilidad (A) y en exacerbación (B). C= colonizados, NC= no colonizados.

Además, no se encontraron diferencias en los índices de diversidad Chao 1 y Shannon entre los pacientes colonizados y no colonizados ni entre estabilidad y exacerbación.

Se representaron las curvas de rarefacción para comprobar si el número de secuencias obtenidas era suficiente para estimar la diversidad de la población en los dos grupos.

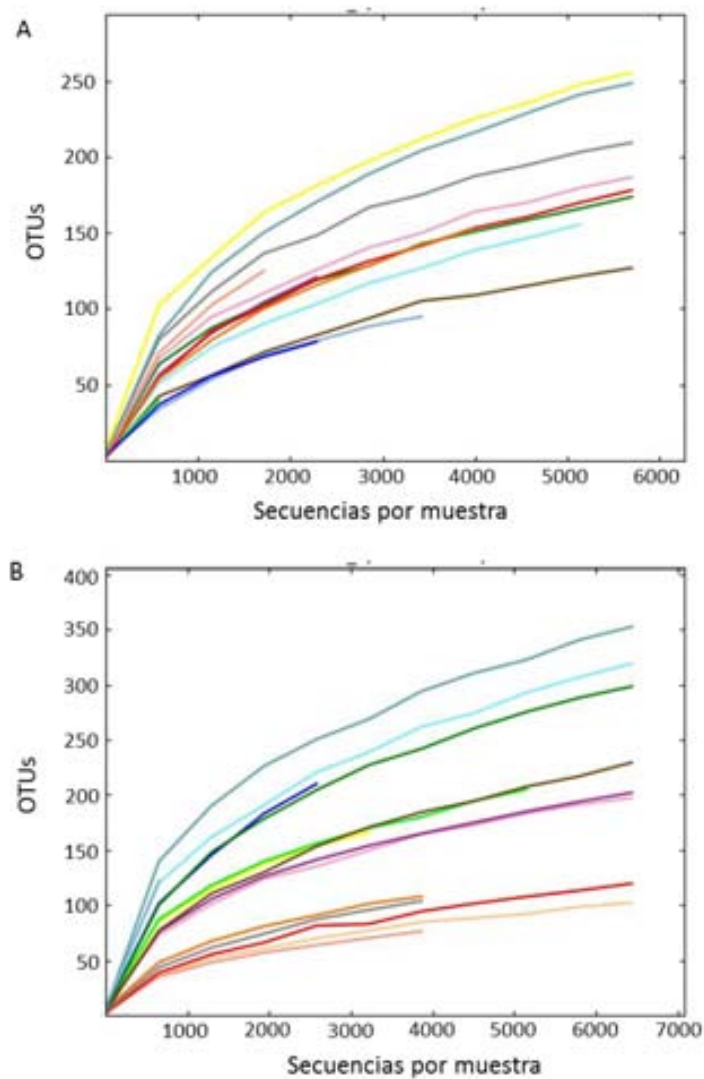


Figura 3. Curvas de rarefacción de las muestras obtenidas en estabilidad (A) y en exacerbación (B).

Para evaluar las diferencias en la composición de la comunidad, se realizó un análisis de coordenadas principales mediante el índice de Bray-Curtis. Además, se representaron los taxones más representativos de las muestras.

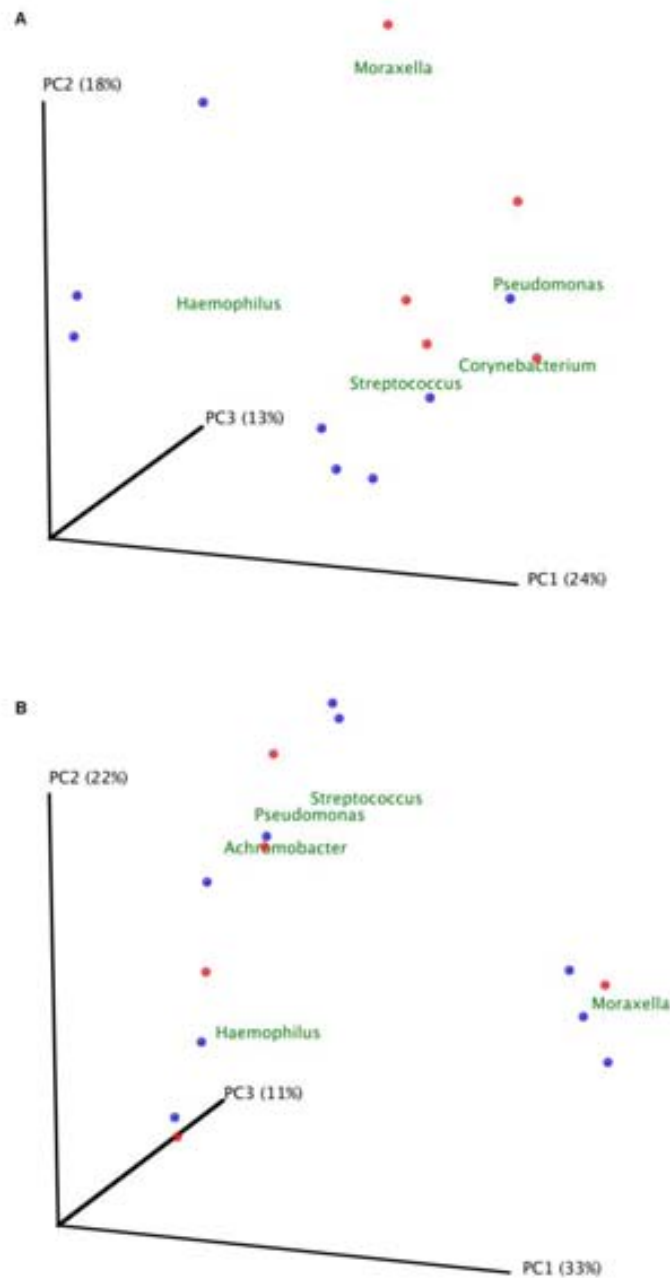


Figura 4. Análisis de coordenadas principales de las muestras en estabilidad (A) y en exacerbación (B). Los puntos rojos representan los pacientes colonizados por *P. aeruginosa* y los azules los pacientes no colonizados.

Se puede distinguir dos grupos en el caso de las muestras de estabilidad, en las que predominan los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Corynebacterium*. Sin embargo, en las muestras obtenidas durante exacerbación, las muestras no se separan en grupos diferenciados.

Se combinaron las muestras de cada situación, colonizados en estabilidad (PS), colonizados en exacerbación (PE), no colonizados en estabilidad (S) y en exacerbación (E) y se hizo una clusterización con la distancia de Bray-Curtis. La comunidad de los pacientes colonizados en exacerbación fue más parecida a la de los pacientes no colonizados, tanto en estabilidad como exacerbación, que la suya propia en estabilidad.

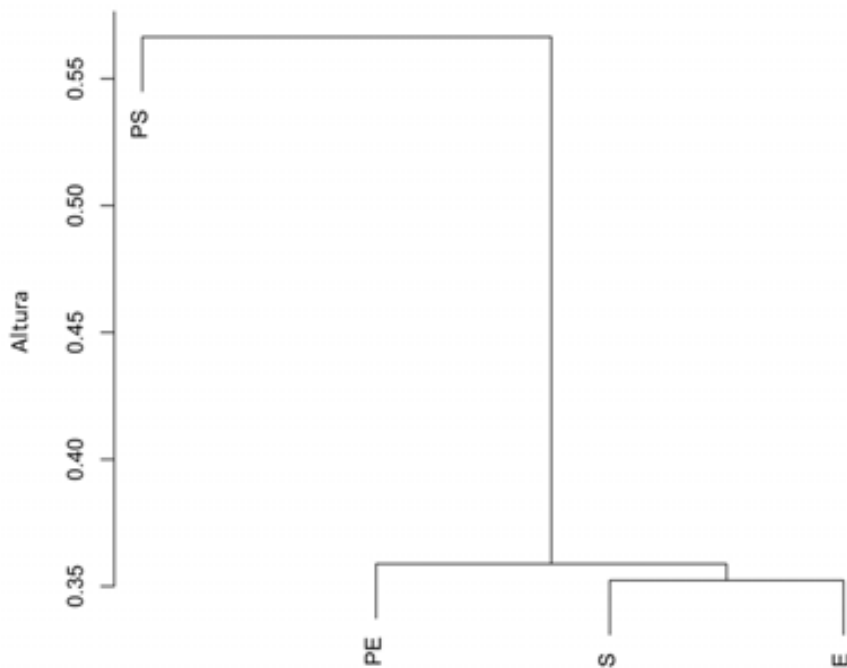


Figura 5. Dendrograma con el índice de Bray-Curtis, que toma valores entre 0 y 1, donde 0 significa que las comunidades son idénticas y 1 que son completamente distintas.

Además, se representaron los géneros más abundantes en las 4 situaciones clínicas y se vieron unos géneros con baja abundancia pero muy prevalentes, como *Veillonella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Gemella*,

Rothia y *Achromobacter*. *Streptococcus* fue el género más abundante en las cuatro situaciones y, aunque *Haemophilus*, *Moraxella* y *Pseudomonas* aparecieron frecuentemente, mostraron una marcada variabilidad dependiendo de la situación. *Pseudomonas* fue el género más común en pacientes estables colonizados por *P. aeruginosa* mientras que *Haemophilus* fue el más abundante en los pacientes no colonizados y durante las exacerbaciones, independientemente de la colonización previa por *P. aeruginosa*.

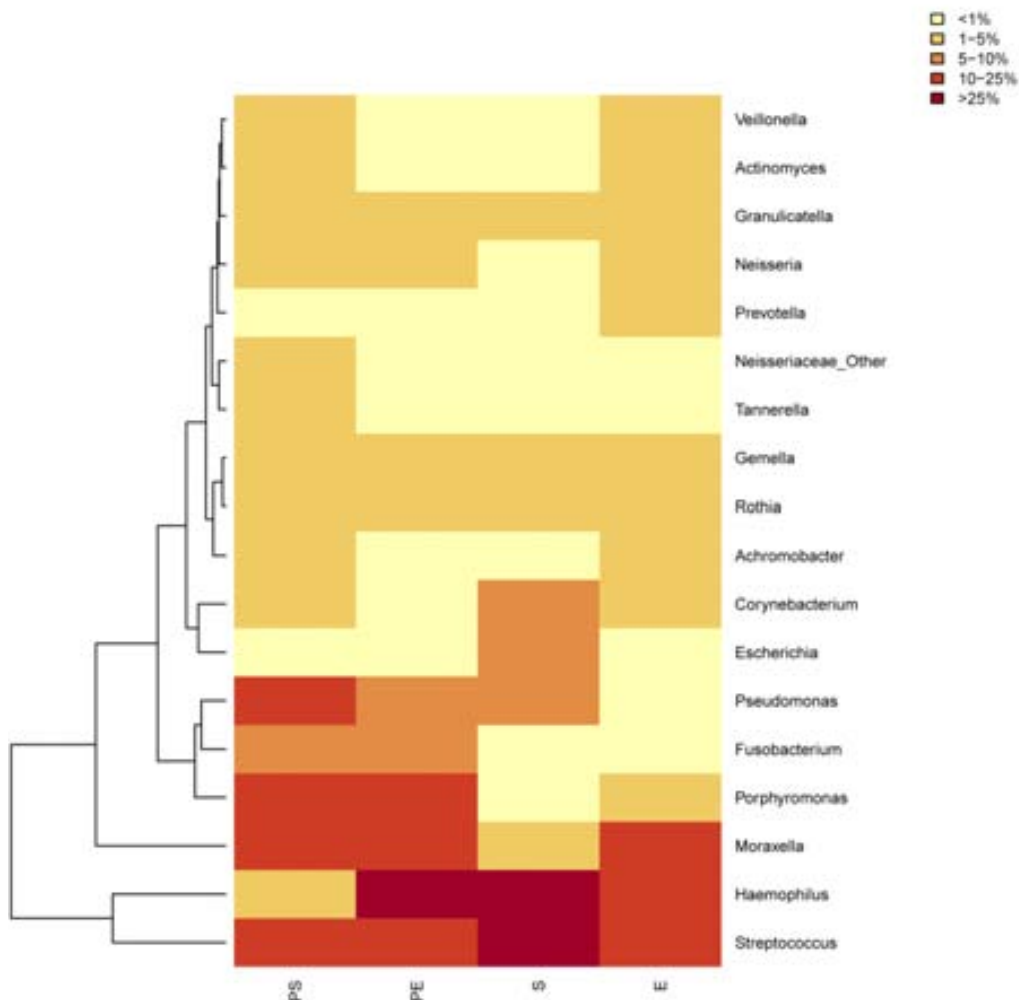


Figura 6. Heat map con los género más abundantes en las cuatro situaciones clínicas.

2.2.4 Variabilidad en el microbioma bronquial durante exacerbación.

Para calcular la variabilidad basal del microbioma se compararon dos muestras de esputo de estabilidad de dos pacientes diferentes. Se comprobó que esta variabilidad estaba por debajo del 20% en todos los géneros detectados, así que se estableció este valor como la referencia (figura 7A). Cuando se calculó la variabilidad entre estabilidad y exacerbación se observó que los géneros en los que había un incremento mayor al 20% en exacerbación fueron *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Achromobacter* y *Corynebacterium*, que incluyen MPPs bien conocidos. Además, estos géneros, cuando no aumentaron su abundancia relativa, presentaron una disminución también por encima del 20%, algo que no se detectó en la microbiota que no incluye MPPs (figura 7B y 7C). Esta variabilidad fue similar en los pacientes colonizados y no colonizados, sin diferencias significativas ($p > 0,05$; χ^2 test) en los géneros que sufrieron incrementos mayores del 20%.

Estos incrementos por encima del 20% identificados por pirosecuenciación del gen 16S ARNr se compararon con los resultados obtenidos por los cultivos microbiológicos tradicionales, con tal de comparar la sensibilidad de los cultivos para detectar cambios en el microbioma bronquial. En 5 de los 13 pacientes (38,5%) los cultivos microbiológicos no detectaron los MPPs pertenecientes a los géneros que presentaron un incremento superior al 20% por pirosecuenciación. En tres de estos pacientes el cultivo de esputo en exacerbación fue negativo, y en otro paciente el cultivo fue positivo para *P. aeruginosa*, mientras que por pirosecuenciación se detectó un incremento del género *Moraxella* y no se detectaron cambios significativos en el género *Pseudomonas*. En el quinto paciente, se detectó un aumento del género *Achromobacter* mediante secuenciación, mientras que por cultivo se detectó *Stenotrophomonas maltophilia* y *Alcaligenes* spp. En dos pacientes, el cultivo de esputo en exacerbación fue positivo para el mismo MPP que se recuperó en estabilidad. Estos pacientes se consideraron colonizados, aunque los resultados de pirosecuenciación no mostraron un aumento superior al 20% para ningún género (Tabla 3).

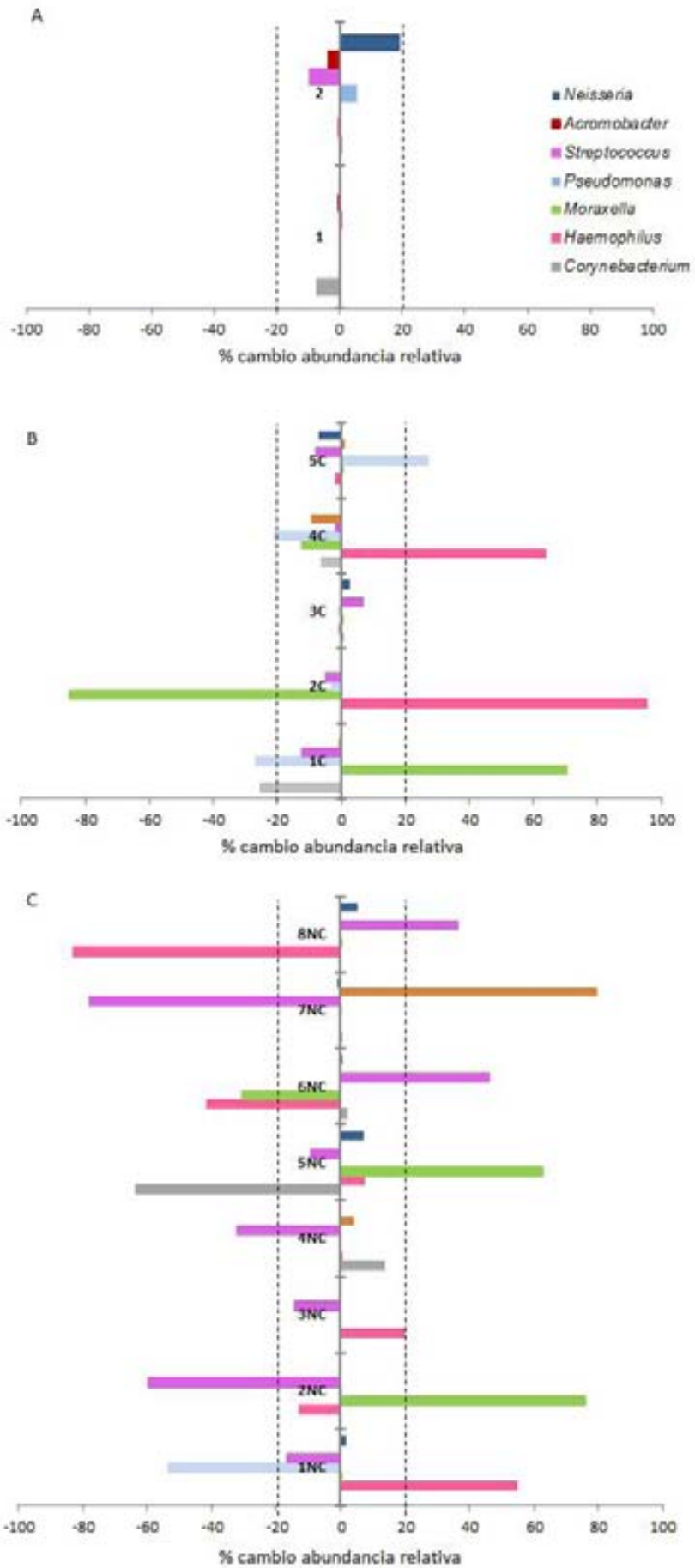


Figura 7. Porcentaje de cambio en la abundancia relativa. Sólo se representan los géneros con un cambio superior al 20% en al menos un paciente. A) Variabilidad observada de los géneros en dos muestras de estabilidad consecutivas de dos pacientes. B) Porcentaje de variabilidad en exacerbación de los pacientes colonizados (n=5). C) Porcentaje de cambio en exacerbación en los pacientes no colonizados (n=7).

Azul oscuro: *Neisseria*; naranja: *Achromobacter*; morado: *Streptococcus*; azul claro: *Pseudomonas*; verde: *Moraxella*; rosa: *Haemophilus*; gris: *Corynebacterium*

Tabla 3. Cambios en el microbioma durante exacerbación detectados por cultivo tradicional y por pirosecuenciación. Solo se detallan los incrementos superiores al 20% en el caso de la pirosecuenciación.

Pacientes	Cultivo tradicional	Pirosecuenciación	Información adicional pirosecuenciación
Colonizados			
1	<i>P. aeruginosa</i>	↑ <i>Moraxella</i>	MPP no detectado por cultivo
2	<i>H. influenzae</i>	↑ <i>Haemophilus</i>	No
3	<i>P. aeruginosa</i>	Cambios < 20%	Colonizado por <i>P. aeruginosa</i>
4	<i>H. influenzae</i>	↑ <i>Haemophilus</i>	No
5	Negativo	↑ <i>Pseudomonas</i>	MPP no detectado por cultivo
No colonizados			
1	<i>H. parainfluenzae</i>	↑ <i>Haemophilus</i>	No
2	<i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i>	↑ <i>Moraxella</i>	No
3	<i>H. influenzae</i>	↑ <i>Haemophilus</i>	No
4	<i>S. pneumoniae</i>	Cambios < 20%	Colonizado por <i>S. pneumoniae</i>
5	Negativo	↑ <i>Moraxella</i>	MPP no detectado por cultivo
6	<i>S. pneumoniae</i>	↑ <i>Streptococcus</i>	No
7	<i>S. maltophilia</i> <i>Alcaligenes spp</i>	↑ <i>Achromobacter</i>	MPP no detectado por cultivo
8	Negativo	↑ <i>Streptococcus</i>	MPP no detectado por cultivo

3. CAMBIOS EN EL MICROBIOMA BRONQUIAL RELACIONADOS CON LA SEVERIDAD EN LOS PACIENTES CON EPOC.

3.1. Resumen

La colonización bronquial por MPPs es común en los pacientes con EPOC. Sin embargo, las técnicas de cultivo microbiológico tradicionales no son adecuadas para identificar hasta el 80% de las bacterias que aparecen en la superficie de las mucosas. El objetivo del trabajo fue determinar las diferencias en el microbioma bronquial de los pacientes con EPOC en función de la severidad de la enfermedad.

Para ello, se analizaron muestras de esputo de cuatro pacientes con enfermedad moderada (tipo A) y 8 pacientes con enfermedad severa (tipo D) en las que se determinó el microbioma bronquial mediante amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr.

Se obtuvieron una media de 3200 secuencias y se identificaron una media de 55 OTUs al 97% de identidad. En los pacientes del grupo moderado los filos más prevalentes fueron *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Estos pacientes presentaron además una mayor diversidad microbiana, medida tanto por el número de OTUs detectados como por el índice de α -diversidad de Shannon. Tanto el análisis de coordenadas principales como la agrupación jerárquica separaron los dos tipos de pacientes en dos grupos bien diferenciados. A nivel de subgénero, 31 OTUs fueron significativamente más abundantes en los pacientes moderados, y un 12% de los OTUs identificados fueron exclusivos de este grupo. Los cambios relacionados con la severidad estuvieron asociados a la aparición de géneros que incluyen MPPs.

De este tercer subestudio se puede concluir que en los pacientes con EPOC severa hay un descenso de la diversidad microbiana y una pérdida de la flora comensal, que es sustituida por una flora que incluye MPPs.

3.2 Metodología

Se reclutaron pacientes diagnosticados con EPOC de severidad moderada y grave, de acuerdo a los criterios de Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease [2], de las categorías tipo A (moderado) y tipo D (severo). Los pacientes fueron examinados tras un periodo de estabilidad de al menos dos semanas, momento en que se les realizaron pruebas funcionales y se recogió información sociodemográfica, hábito tabáquico, síntomas respiratorios, frecuencia de exacerbación y tratamiento. El grupo EPOC moderada tipo A constaba de pacientes con un FEV₁ por encima del 50% de la referencia sin exacerbaciones el año previo y sin necesidad de terapia broncodilatadora regular. Los pacientes sintomáticos con FEV₁ por debajo del 50%, con más de dos exacerbaciones el año previo se asignaron al grupo EPOC severa tipo D.

Se recogieron muestras de esputo espontáneas para cultivo microbiológico. Se realizaron cultivos selectivos para la detección de MPPs, y se consideraron positivos aquellos que presentaron una concentración de 100 o más unidades formadoras de colonias por mililitro. Se consideraron MPPs microorganismos gram positivos y negativos reconocidos causantes de infección respiratoria, como *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y enterobacterias.

A partir de la muestra de esputo se hizo una extracción de ADN para la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr. Se amplificaron las regiones hipervariables V1-V2 mediante cebadores universales y se secuenciaron en el equipo 454 GS-FLX System Titanium Chemistry de ROCHE. Las secuencias obtenidas se filtraron con el programa mothur, para eliminar quimeras y secuencias más cortas de 200 pb, y se procesaron con el programa QIIME para obtener la información taxonómica, mediante la identificación de OTUs a un 97% de similitud.

Para el análisis estadístico se usó el paquete estadístico SPSS, el programa LEfSe y R, para construir los *heat maps*. Se calculó el índice de Shannon como parámetro de α -diversidad y el índice de disimilitud de Bray-Curtis para el análisis de coordenadas principales.

3.3 Resultados

3.3.1 Características de los pacientes

Se incluyeron 4 pacientes con EPOC moderada tipo A y 8 pacientes con enfermedad severa tipo D. Todos eran exfumadores con una edad media de 70 años (DE 7) (Tabla 1). Los cultivos de esputo fueron negativos para los pacientes del grupo moderado y, en el grupo severo, 6 pacientes (66,7%) tuvieron cultivos positivos, en cuatro de ellos se detectó *H. influenzae* y en los otros dos *S. pneumoniae* y *E. coli*.

Tabla 1. Características de los pacientes.

	EPOC Moderado	EPOC Severo
	Pacientes tipo A	Pacientes tipo D
	(n=4)	(n=8)
Edad (años), media (DE)	66 (7)	72 (6)
Género (hombres), n (%)	3 (75)	8 (100)
FEV1 post-BD (% predicho), mediana (IQR)	69 (43,5-81,7)	33 (30,2-35)
Índice BODE, mediana (IQR)	0.5 (0-1.75)	6,5 (5,2-8)
Cultivos positivos para MPPs, n (%)	0 (0)	6 (75)

3.3.2 Microbioma bronquial

Se encontró una media de 3200 secuencias (1384-6007) en las muestras de esputo, con una media de 55 OTUs (DE 26) al 97% de identidad. El número de secuencias obtenidas fue suficiente para estimar la diversidad de la población en ambos grupos.

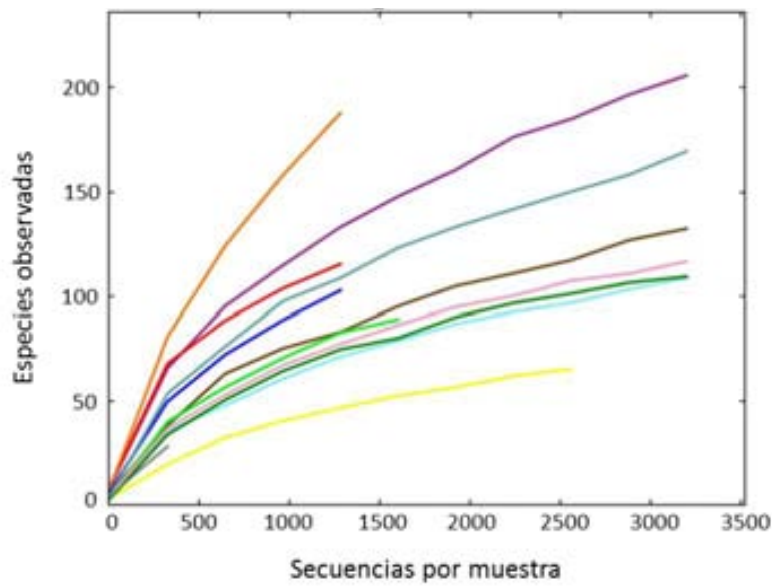


Figura 1. Curvas de rarefacción. Cada curva representa una muestra y refleja el número de OTUs encontrados en esa muestra a diferentes niveles de secuenciación.

En el grupo moderado se detectaron menos secuencias que el severo (1430 vs 5710 secuencias), aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p=0,089$).

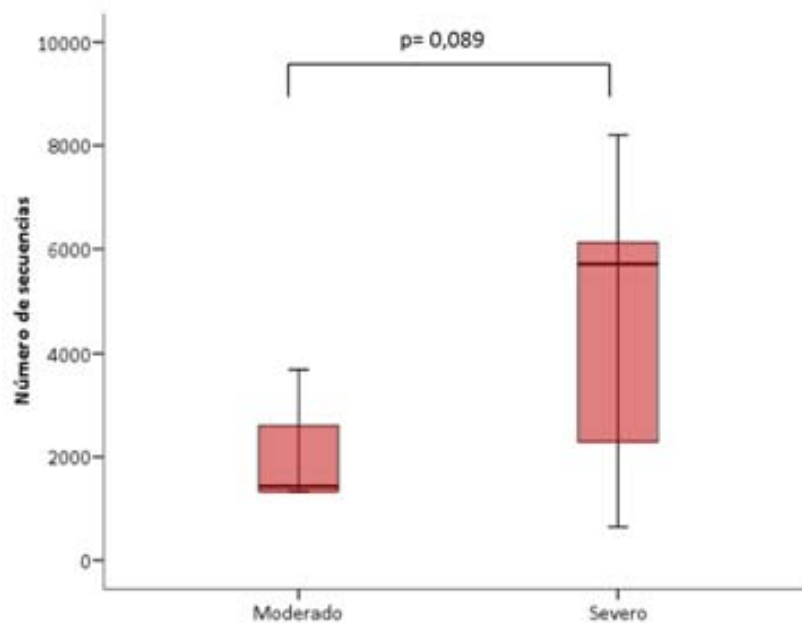


Figura 2. Número de secuencias que se obtuvieron en los grupos moderado y severo.

Los filos más prevalentes fueron *Proteobacteria* (40,7%) y *Firmicutes* (20,4%), seguidos de *Actinobacteria* (3,8%) y *Bacteroidetes* (2,1%). Se encontraron también proporciones bajas (<2%) de *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *SR1*, *TM7* y *GN02*. En el grupo de pacientes moderados los filos *Firmicutes* (36,8%) y *Proteobacteria* (32,2%) fueron los más prevalentes, seguidos de *Bacteroidetes* (14,9%) mientras que en el grupo de pacientes severos los más abundantes fueron los más abundantes fueron *Proteobacteria* (72,3%) y *Firmicutes* (19,2%) seguidos por *Actinobacteria* (5,4%). La abundancia relativa de los filos *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* y *SR1* fue significativamente más elevado en los pacientes moderados.

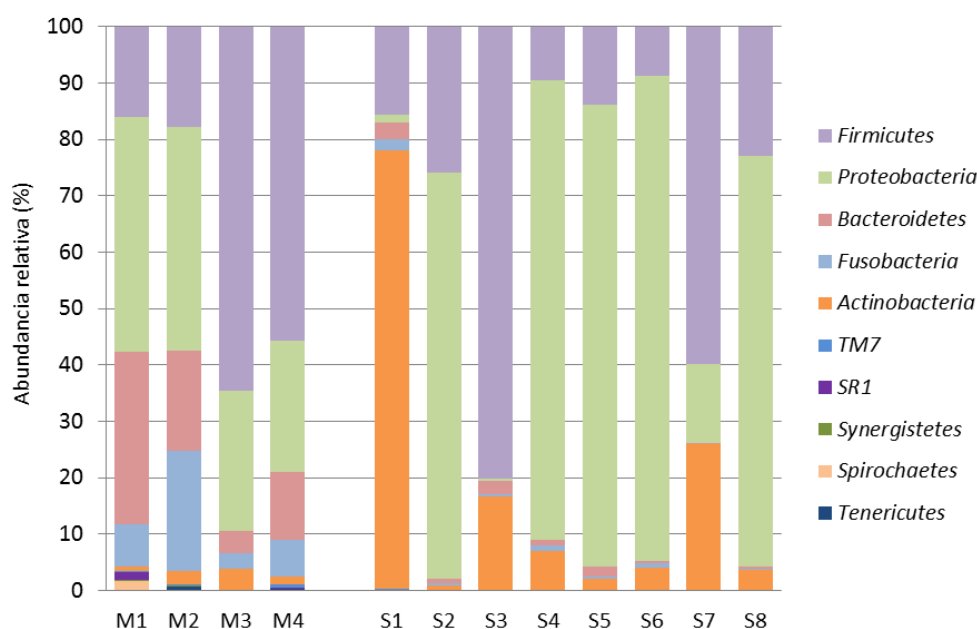


Figura 3. Abundancia relativa de los filos encontrados en los pacientes con enfermedad moderada (M) y severa (S).

Los pacientes con enfermedad moderada presentaron mayor α -diversidad que los pacientes con enfermedad severa, con diferencias significativas tanto en el número de OTUs detectados ($p=0,027$) como en el índice de Shannon ($p=0,007$).

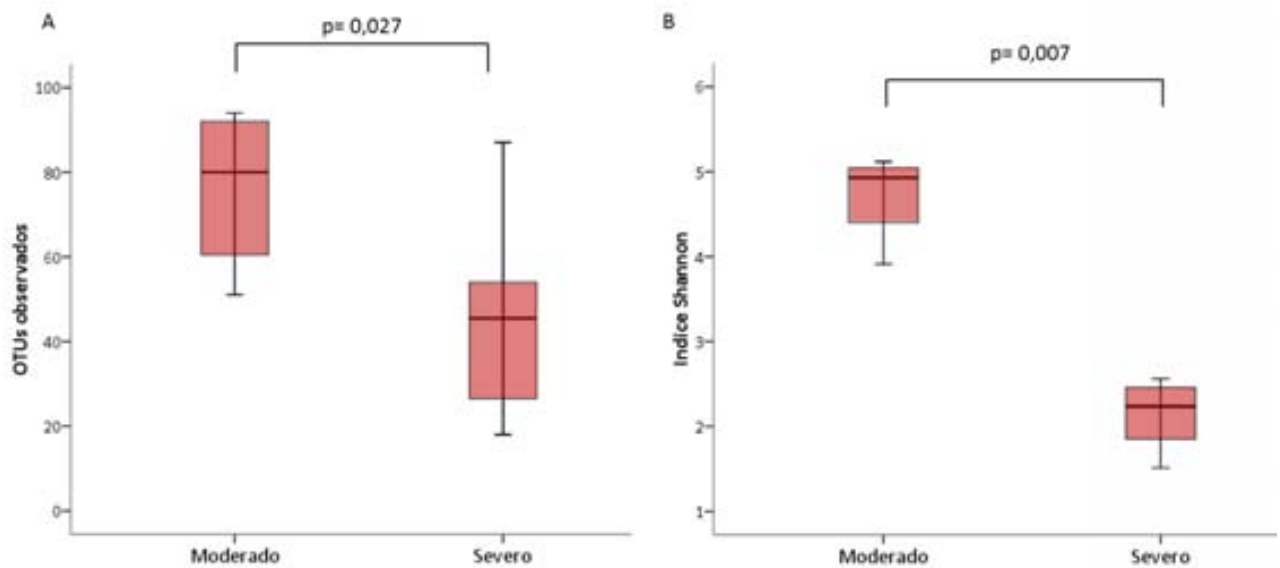


Figura 4. Número de OTUs observados (A) e índice de Shannon (B) en los pacientes moderados y severos.

Se realizó un análisis de coordenadas principales con el índice de disimilitud de Bray-Curtis para conocer si había diferencias en la composición de la comunidad (figura 5). Se observó cómo los dos grupos de pacientes se separaron en dos grupos bien diferenciados. Asimismo, el agrupamiento jerárquico con las abundancias relativas de los géneros separó las muestras en dos grupos diferentes (figura 6).

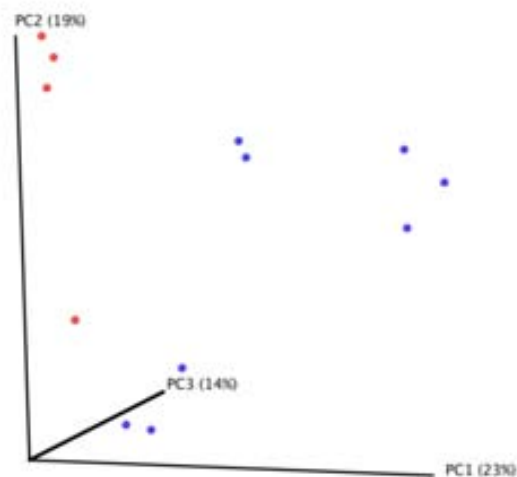


Figura 5. Análisis de coordenadas principales con el índice de Bray-Curtis. Los puntos rojos representan a los pacientes con enfermedad moderada y los azules a los pacientes con enfermedad severa.

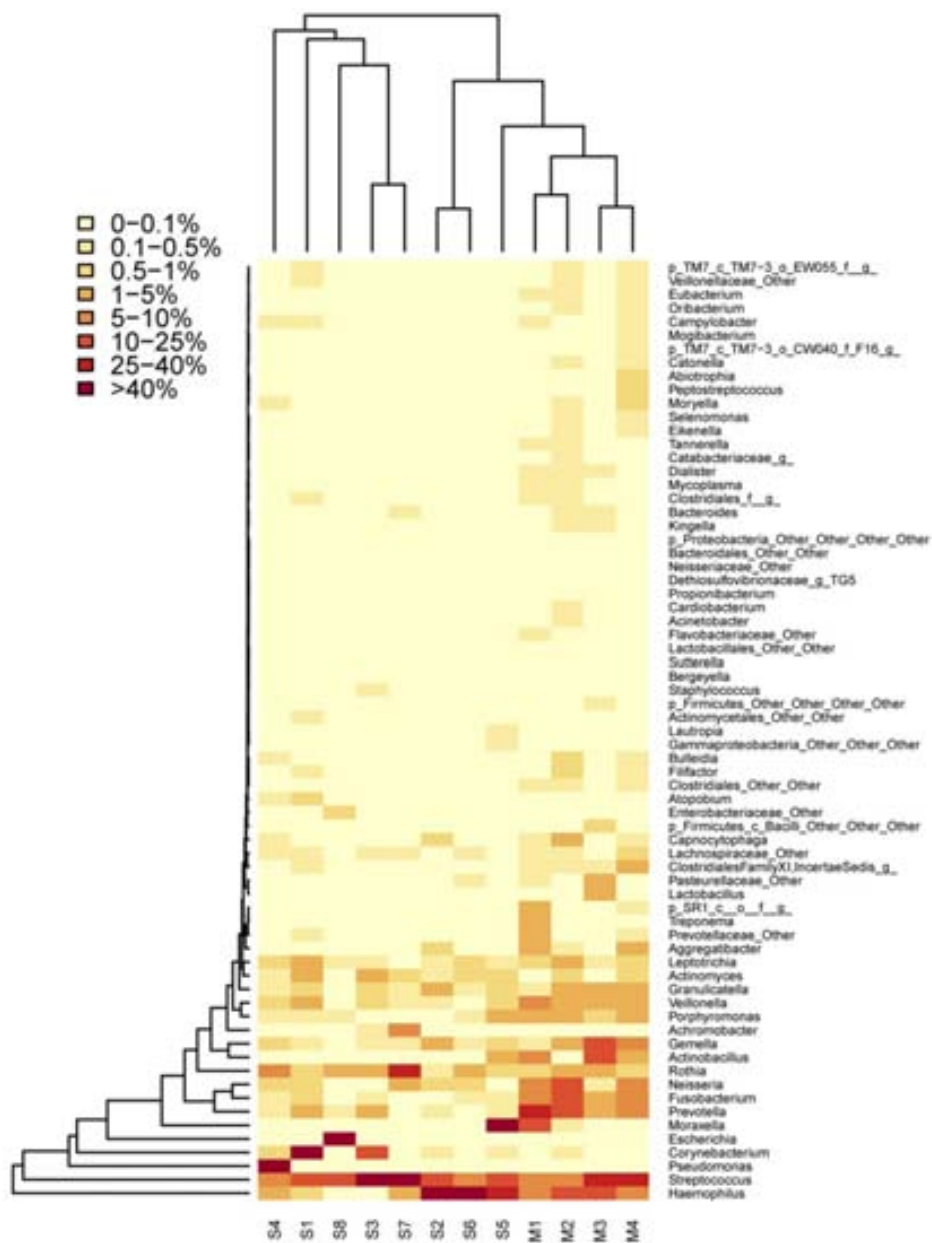


Figura 6. Heat map que representa las abundancias relativas de los géneros encontrados en los pacientes moderados (M) y los severos (S).

El análisis discriminante lineal (LDA) identificó 86 OTUs con diferencias significativas entre los dos grupos. A nivel de subgénero fueron 31, de los cuales 30 tuvieron significativamente mayor abundancia relativa en los pacientes del grupo moderado. Estos 31 subgéneros correspondían a 24 géneros diferentes, de los cuales 20 fueron significativamente más abundantes en los pacientes moderados,

representando el 30,3% de la abundancia relativa (IQR 13,3-62) en este grupo y sólo el 1,1% en el grupo severo (IQR 0,2-3,5) (Tabla 2).

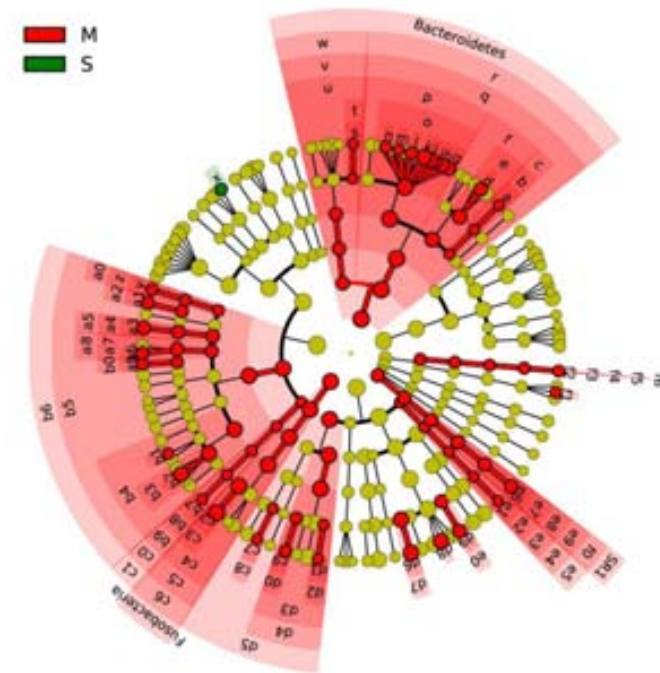


Figura 7. Cladograma que representa las características diferenciales de cada estadio de la enfermedad usando un modelo LDA. Los OTUs bacterianos con mayor abundancia en los pacientes moderados se representan en rojo y en los pacientes severos en verde oscuro. En verde claro aparecen los OTUs que no tienen diferencias estadísticas. La leyenda de la figura aparece en la siguiente tabla.

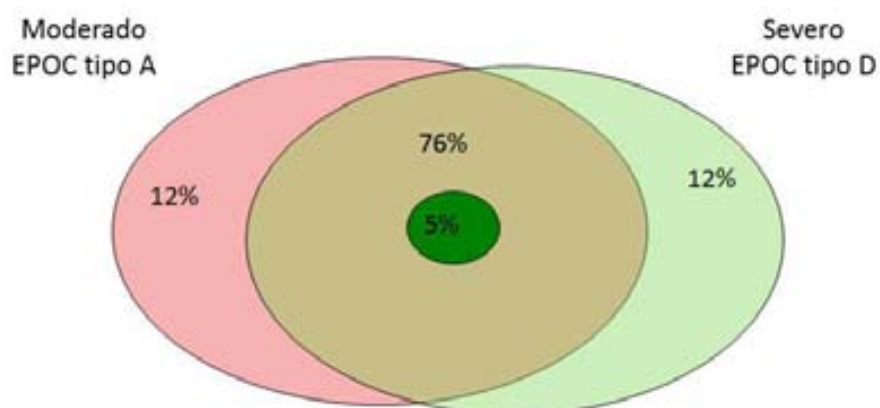
Espece	Género	Familia	Orden	Clase	Filo
a: <i>Bacteroidales_f_g_s</i>	b: <i>Bacteroidales_f_g</i>	c: <i>Bacteroidales_f</i>	q: <i>Bacteroidales</i>	r: <i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroides</i>
d: <i>Porphyromonas endodontalis</i>	e: <i>Porphyromonas</i>	f: <i>Porphyromonadaceae</i>			
g: <i>Prevotella_s1</i>	o: <i>Prevotella</i>	p: <i>Prevotellaceae</i>			
h: <i>Prevotella_s2</i>					
i: <i>Prevotella baroniae</i>					
j: <i>Prevotella intermedia</i>					
k: <i>Prevotella melaninogenica</i>					
l: <i>Prevotella nigrescens</i>					
m: <i>Prevotella oulorum</i>					
n: <i>Prevotella tanneriae</i>					
s: <i>Bergeyella_s</i>	t: <i>Bergeyella</i>	u: <i>Flavobacteriaceae</i>	v: <i>Flavobacteriales</i>	w: <i>Flavobacteria</i>	
x: <i>Granulicatella_s</i>					
y: <i>Catabacteriaceae_g_s</i>	z: <i>Catabacteriaceae_g</i>	a0: <i>Catabacteriaceae</i>	b5: <i>Clostridiales</i>	b6: <i>Clostridia</i>	
a1: <i>Eubacterium_S</i>	a2: <i>Eubacterium</i>				
a3: <i>Parvimonas micra</i>	a4: <i>Parvimonas</i>	a5: <i>ClostridialesFamilyXI_IncertaeSedis</i>			
a6: <i>Clostridiales_f_g_s2</i>	a7: <i>Clostridiales_f_g</i>	a8: <i>Clostridiales_f</i>			
a9: <i>Catonella_S</i>	b0: <i>Catonella</i>				
b1: <i>Selenomonas_s1</i>		b4: <i>Veillonellaceae</i>			
b2: <i>Veillonella_s2</i>	b3: <i>Veillonella</i>				
b7: <i>Firmicutes_c_o_f_g_s</i>	b8: <i>Firmicutes_c_o_f_g</i>	b9: <i>Firmicutes_c_o_f</i>	c0: <i>Firmicutes_c_o</i>	c1: <i>Firmicutes_c</i>	
c2: <i>Fusobacterium_s</i>	c3: <i>Fusobacterium</i>	c4: <i>Fusobacteriaceae</i>	c5: <i>Fusobacteriales</i>	c6: <i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>
c7: <i>Sutterella_s</i>	c8: <i>Sutterella</i>				
c9: <i>Eikenella corrodens</i>	d0: <i>Eikenella</i>	d3: <i>Neisseriaceae</i>	d4: <i>Neisseriales</i>	d5: <i>Betaproteobacteria</i>	
d1: <i>Neisseriaceae_g_s</i>	d2: <i>Neisseriaceae_g</i>				
d6: <i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	d7: <i>Actinobacillus</i>				
d8: <i>Haemophilus_s2</i>					

Tabla 2. Diferencias en la abundancia relativa a nivel de género entre los dos grupos de pacientes.

Filo	Genero	Abundancia relativa (%)				p
		Moderado	mediana (IQR)		Severo	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Eikenella</i>	0,1	(0,02-0,3)	0,00	(0-0)	0,007
	<i>Actinobacillus</i>	3,6	(0,07-10)	0,00	(0-0)	0,008
	<i>Sutterella</i>	0,03	(0-0,08)	0,00	(0-0)	0,037
	<i>Neisseriaceae</i> (Otros)	0,03	(0-0,08)	0,00	(0-0)	0,037
	<i>Proteobacteria</i> (Otros)	0,03	(0-0,07)	0,00	(0-0)	0,037
	<i>Pasteurellaceae</i> (Otros)	0,2	(0,07-1,6)	0,02	(0-0,08)	0,038
<i>Firmicutes</i>	<i>Catonella</i>	0,1	(0,06-0,15)	0,00	(0-0,01)	0,004
	<i>Veillonella</i>	4,6	(4-5)	0,5	(0,1-0,9)	0,007
	<i>Parvimonas</i>	0,3	(0,14-1,4)	0,00	(0-0,04)	0,008
	<i>Clostridiales</i> (Otros)	0,3	(0,08-0,6)	0,00	(0-0)	0,020
	<i>Catabacteriaceae</i> (Otros)	0,04	(0-0,2)	0,00	(0-0)	0,037
	<i>Firmicutes</i> (Otros)	0,01	(0-0,12)	0,00	(0-0)	0,037
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Eubacterium</i>	0,2	(0,04-0,3)	0,00	(0-0,01)	0,037
	<i>Prevotella</i>	11,3	(4,2-23)	0,18	(0,07-1,7)	0,007
	<i>Porphyromonas</i>	2,9	(1,4-3,5)	0,3	(0,01-0,4)	0,011
	<i>Bacteroidales</i> (Otros)	0,03	(0-0,07)	0,00	(0-0)	0,037
<i>Fusobacteria</i>	<i>Bergeyella</i>	0,01	(0-0,06)	0,00	(0-0)	0,037
	<i>Fusobacterium</i>	6,3	(3,3-13)	0,2	(0,05-0,3)	0,007
<i>SR1</i>	<i>SR1</i>	0,15	(0-1,3)	0,00	(0-0)	0,037
<i>Tenericutes</i>	<i>Mycoplasma</i>	0,07	(0-0,2)	0,00	(0-0)	0,037
TOTAL		30,3	(13,3-61,9)	1,14	(0,2-3,5)	----

Otros: OTUs no identificados a nivel de subgénero en los que se pone el nivel taxonómico más bajo.

El diagrama de Venn mostró que tanto en el grupo moderado como en el severo hay un 12% de subgéneros exclusivos y el 76% restante es común. Se definió un núcleo del microbioma bronquial como aquellos OTUs que están presentes en el 100% de los pacientes. En este caso estuvo compuesto por 6 OTUs, *Rothia mucilaginosa*, *Gemella spp*, *Granulicatella adiacens*, *S. pneumoniae*, *Veionella spp* y *Streptococcus spp*, que representaron un 5% de la riqueza total.



Moderado	Núcleo microbiota bronquial	Severo
<i>Prevotella baroniae</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
<i>Bergeyella spp.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Actinomyces orys</i>
<i>Selenomonas spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Corynebacterium confusum</i>
<i>Sutterella spp.</i>	<i>Veillonella spp.</i>	<i>Corynebacterium durum</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Gemella spp.</i>	<i>Rothia aeria</i>
<i>Bulleidia extructa</i>		<i>Staphylococcus spp.</i>
<i>Mycoplasma spp.</i>		<i>Achromobacter spp.</i>
<i>Bacteroidales</i> (otros)		<i>Actinomycetales</i> (otros)
<i>Catabacteriaceae</i> (otros)		<i>Propionibacterium spp.</i>
<i>Firmicutes</i> (otros)		<i>Atopobium spp.</i>
<i>Neisseriaceae</i> (otros)		<i>Granulicatella spp.</i>
<i>Proteobacteria</i> (otros)		<i>Lautropia spp.</i>
SR1 (otros)		<i>Gammaproteobacteria</i> (otros)

DISCUSIÓN

Se considera colonización la presencia de un microorganismo en un espacio que normalmente se considera estéril donde no causa daño tisular o no desencadena una respuesta en el huésped [43]. Ante esta definición, sin embargo, diferentes investigadores han sugerido que la presencia de MPPs en la vía aérea de los pacientes con EPOC contribuye a la inflamación crónica que caracteriza la enfermedad y favorece su progresión, aun en ausencia de síntomas [43, 45, 46, 52]. La inflamación que genera la colonización bronquial es neutrofílica, con la IL-8 como su mediador más importante. Los niveles elevados de IL-8 y neutrófilos en las secreciones bronquiales se han asociado a un empeoramiento funcional [43], por lo que es plausible que la inflamación provocada por la colonización pueda contribuir a la progresión de la EPOC.

En un tercio de los pacientes con EPOC en estabilidad se detectan MPPs en las secreciones respiratorias, un porcentaje que aumenta con el empeoramiento del trastorno ventilatorio obstructivo [43]. *H. influenzae* es el microorganismo que más frecuentemente aparece colonizando las vías aéreas de estos pacientes, tanto en estabilidad como durante una exacerbación [64].

La respuesta inmune innata y adaptativa conforman los mecanismos de defensa de la vía respiratoria ante estímulos externos. La respuesta innata incluye la barrera epitelial y el sistema mucociliar, además de la respuesta inflamatoria. Esta respuesta reacciona rápidamente pero tiene poca especificidad, diversidad y no tiene memoria. La respuesta inmune adaptativa, por el contrario, se desarrolla más lentamente, pero es altamente específica, muy diversa y tiene una extraordinaria memoria [28]. En la mucosa bronquial, el representante más importante de la respuesta adaptativa es la IgA, que tiene la capacidad de aglutinar las bacterias para su eliminación, además de bloquear la adherencia de microorganismos y antígenos a la mucosa bronquial [65]. Ya que la primera línea de defensa específica contra *H. influenzae* viene dada por la IgA, los niveles de esta inmunoglobulina podrían desempeñar un papel importante en la patogénesis de la colonización bronquial y de la infección en la EPOC.

Los bajos niveles de IgA específica contra *H. influenzae* encontrados en los pacientes colonizados de nuestro estudio, pueden estar relacionados con la producción de proteasas contra IgA por parte de este microorganismo, con una

respuesta inmune defectuosa en los pacientes, o con el consumo de la inmunoglobulina por el propio individuo. Se han encontrado niveles bajos de IgA en el BAL de fumadores [75] y, en pacientes con EPOC y bronquiectasias, el nivel de IgA corregido por el nivel de albúmina también se ha observado disminuido [76]. Asimismo, la sIgA aparece disminuida en el BAL de los pacientes con EPOC y se considera que el epitelio bronquial dañado podría impedir el transporte adecuado de la IgA a la superficie mucosa [121]. En un estudio inmunohistoquímico del epitelio respiratorio de pacientes con EPOC se observó además una disminución en la expresión del componente secretor, lo que se asocia a una deficiencia de sIgA [122]. Todo esto sugiere la existencia de un defecto en la producción de IgA en la mucosa bronquial del paciente con EPOC que podría conducir a la colonización e infección bacteriana. Por otra parte, las cepas de *H. influenzae* producen proteasas que eliminan la IgA1, partiendo la cadena pesada de la inmunoglobulina y separando el fragmento de unión al antígeno (Fab) y el fragmento constante (Fc), por lo que la inmunoglobulina pierde su funcionalidad [123, 124]. Así, tanto una baja producción de IgA como la liberación de proteasas por *H. influenzae* podrían justificar los niveles significativamente más bajos de la IgA específica contra este microorganismo en los pacientes colonizados de nuestro estudio.

Los pacientes colonizados por *H. influenzae* presentaron además concentraciones más elevadas de la proforma y la forma activa de MMP-9 con respecto a los pacientes no colonizados. Varios estudios han descrito la presencia de una relación entre colonización y los niveles de los marcadores de inflamación en los pacientes con EPOC, que presentan niveles elevados de IL-1 β e IL-8 en las secreciones bronquiales [44, 52, 125], un efecto que es aún superior cuando el microorganismo que coloniza es *H. influenzae* [126]. Se sabe que la IL-1 β estimula la liberación de MMPs por los macrófagos alveolares e incrementa la actividad de las MMPs en los pacientes con EPOC [127]. Además, se han relacionado a miembros de la familia de las MMPs con la destrucción bronquiolar y alveolar, lo que provoca enfisema [128]. En estudios con ratones que sobre-expresan MMP-1 se ha visto que desarrollan enfisema, mientras que ratones *knock out* para MMP-12 están protegidos contra enfisema a pesar de exposiciones prolongadas al humo de tabaco [129]. En los pacientes con EPOC se han encontrado concentraciones elevadas de MMP-8, MMP-9 y TIMP-1 en

secreciones bronquiales [130, 131], y también se han observado niveles elevados de MMP-9 en fumadores con EPOC en comparación con fumadores sin limitación al flujo aéreo [132, 133]. Asimismo, se ha descrito un incremento en la expresión y actividad de la MMP-9 en el parénquima pulmonar y un ratio MMP-9/TIMP-1 elevado en esputo inducido de los pacientes con EPOC en comparación con individuos sanos [134]. En condiciones normales, los TIMPs son las proteínas que controlan fisiológicamente la actividad de las MMPs, y se ha propuesto que la causa de los niveles elevados de MMP-9 en los pacientes con EPOC puede ser un desequilibrio entre ésta y su inhibidor [40, 41, 130, 135, 136]. El mayor inhibidor de MMP-9 y MMP-8 es TIMP-1, que también aparece con concentraciones elevadas en los pacientes con EPOC [40].

En este estudio hemos encontrado niveles elevados de la proforma y la forma activa de la MMP-9 en los pacientes colonizados por *H. influenzae*, por lo que la presencia de este microorganismo en el árbol bronquial puede tener un efecto en la matriz extracelular. Además, el ratio molar entre la proforma de MMP-9 y TIMP-1 estuvo por encima de 1 y fue significativamente más alto en los pacientes colonizados. Los ratios entre MMP-9 y TIMP-1 por debajo de 1:1 mantienen a la MMP-9 por debajo de su nivel de actividad, y es lo que se encuentra en los individuos sanos [128]. Valores de este ratio por encima de 1:1 se consideran anormales y están relacionados con una mayor presencia de la forma activa de MMP-9 en las secreciones bronquiales, con niveles suficientemente altos como para estar relacionados con enfermedad [41]. De hecho, el remodelado de la vía aérea de pequeño calibre, en el que intervienen las metaloproteinasas, se acepta como causa del trastorno ventilatorio obstructivo observado en los pacientes con EPOC [129].

La respuesta inmune defectuosa podría ser la causa de la presencia de *H. influenzae* en la vía aérea. Esta presencia tiene un impacto en la actividad de las metaloproteinasas, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que la presencia de microorganismos colonizantes facilita el daño estructural y fomenta con ello la evolución de la enfermedad. Sin embargo, *H. influenzae* no es el único microorganismo que aparece como colonizador de la vía aérea en estos pacientes, ya que *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa* son también frecuentemente aislados, por lo que es posible que también tengan un protagonismo en la evolución de la

enfermedad.

Las nuevas técnicas de detección microbiológicas no dependientes de cultivo han puesto de manifiesto que la composición de la comunidad microbiana de las vías aéreas tiene una gran diversidad, por lo que puede tener una mayor relevancia de la inicialmente estimada en la progresión de la EPOC, y no sólo la presencia de MPPs conocidos. Tradicionalmente se consideraba que la vía aérea del individuo sano era estéril pero el uso de técnicas microbiológicas de nueva generación independientes de cultivo ha mostrado que la vía respiratoria contiene una microbiota característica que difiere entre los estados de salud y de enfermedad. En el tracto digestivo, las poblaciones microbianas juegan un papel importante para la salud ya que instruyen el desarrollo del sistema inmune, promueven la angiogénesis intestinal y ayudan a la digestión. La alteración de esta microbiota, por la toma de antibióticos por ejemplo, permite la colonización de la mucosa digestiva por microorganismos patógenos ajenos a la flora intestinal [114]. Sin embargo, el papel de la microbiota de la vía aérea del paciente con EPOC en la patogénesis y progresión de la enfermedad no está definido.

La severidad de la enfermedad está asociada a una mayor prevalencia de *P. aeruginosa* en la vía aérea de los pacientes con EPOC [68, 137]. Esta presencia se asocia a un aumento en la frecuencia de exacerbación [51, 137–141]. En un estudio reciente en el que se recogieron muestras de secreciones bronquiales secuenciales de pacientes con enfermedad avanzada relacionó la adquisición de una nueva cepa de este microorganismo con la aparición de síntomas de exacerbación [142]. La persistencia de *P. aeruginosa* en los cultivos de secreciones bronquiales después de una exacerbación aparece sólo en una minoría de los pacientes con EPOC, ya que en muchos casos es un fenómeno transitorio [143]. Sin embargo, la persistencia de este microorganismo como colonizador se ha descrito en una quinta parte de los pacientes con EPOC con cultivo positivo para este MPP [142–144], y es mucho más común en los pacientes con bronquiectasias asociadas [145]. Los pacientes con EPOC severa que tienen cultivos positivos para este microorganismo tienen peor pronóstico cuando tienen una exacerbación [141], y en estos casos, el uso de antibióticos contra este microorganismo es práctica común validada por las guías en uso [144, 146], aunque este planteamiento terapéutico está abierto a debate [67].

Para afrontar el problema de la etiología de la exacerbación en los pacientes

con EPOC y colonizados por *P. aeruginosa*, en el siguiente trabajo se analizó y se determinaron las características del microbioma bronquial de los pacientes con EPOC severa en estabilidad colonizados y no colonizados por *P. aeruginosa*, y los cambios que aparecen en este microbioma cuando aparece una exacerbación. Se definió colonización por *P. aeruginosa* cuando se aisló este microorganismo en 3 o más cultivos de esputo consecutivos en un periodo de tiempo de 6 meses. De esta forma, se categorizaron los pacientes entre colonizados y no colonizados y se analizaron muestras de ambos grupos de pacientes en estabilidad y de exacerbación.

Se encontró que las vías respiratorias de los pacientes con EPOC severa muestran un amplio rango de géneros prevalentes, de acuerdo con lo observado en individuos sanos y pacientes con EPOC moderada [112, 114, 147]. Así, la diversidad bacteriana en las vías respiratorias inferiores de los pacientes con EPOC severa es elevada, con una comunidad microbiana compleja que incluye los géneros *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Gemella*, *Rothia* y *Achromobacter*. *Pseudomonas* fue el género más prevalente en los pacientes que presentaban colonización por *P. aeruginosa*, y *Haemophilus* más frecuente en los pacientes no colonizados. Además, a pesar de la presencia de *P. aeruginosa* en un subgrupo de pacientes, no se encontraron diferencias significativas en los índices de α -diversidad Chao-1 y Shannon entre los pacientes colonizados y no colonizados, lo que sugiere que la presencia de *P. aeruginosa* no altera la diversidad de la microbiota bronquial en la EPOC severa. La presencia de una microbiota diversa está relacionada con la integridad epitelial y la regulación inmune [112, 148–150] y cambios en la composición de la comunidad pueden comprometer la salud y contribuir a la progresión de la enfermedad. Estudios recientes basados en las nuevas técnicas microbiológicas independientes de cultivo han establecido cambios en el microbioma en varias enfermedades crónicas, como la fibrosis quística y la enfermedad inflamatoria intestinal [109]. En base a estos resultados, la colonización bronquial por *P. aeruginosa* no estaría asociada a la aparición de alteraciones significativas en la microbiota bronquial en los individuos con EPOC severa.

La comunidad bacteriana durante una exacerbación en pacientes colonizados

por *P. aeruginosa* cambió a una microbiota más similar a la que se encuentra en los pacientes no colonizados en exacerbación, lo que sugiere que estos episodios en los pacientes colonizados pueden mayoritariamente deberse a otros MPPs en lugar de *P. aeruginosa*. En los pacientes con EPOC severa se aísla con una cierta frecuencia *P. aeruginosa* en los cultivos de esputo en periodos de estabilidad clínica [51, 137–141]. Cuando la colonización es persistente, el pronóstico es peor cuando aparece una exacerbación [141] por lo que se aconseja un tratamiento precoz del episodio. La recomendación clínica en estos casos es el tratamiento antibiótico contra *P. aeruginosa* [146] y en adultos con EPOC este tratamiento está justificado por las características que esta enfermedad comparte con la fibrosis quística, enfermedad en la que *P. aeruginosa* causa colonización crónica y que está asociada con una significativa morbilidad y mortalidad [151–153]. Sin embargo, hay que ser cautos al extrapolar las observaciones de fibrosis quística a EPOC ya que el patrón de colonización es diferente en las dos enfermedades [143, 154, 155]. Los resultados de este trabajo sugieren que los síntomas de exacerbación en los pacientes con EPOC severa colonizados están fundamentalmente relacionados con los MPPs que normalmente causan exacerbación en los pacientes con enfermedad avanzada, independientemente de la colonización previa por *P. aeruginosa*.

En nuestro estudio se analizó también la variabilidad en la abundancia de los géneros encontrados durante estabilidad y exacerbación, y en los pacientes con EPOC severa establece la variabilidad en la abundancia relativa en visitas consecutivas se situó por debajo del 20% en todos los géneros detectados. Sin embargo, cuando aparece una exacerbación, la variabilidad fue mayor que este valor de referencia para determinados géneros, entre los que se encuentran *Haemophilus*, *Moraxella* y *Streptococcus*, todos ellos con MPPs entre las especies que los conforman. Esta observación confirma que, en la mayoría de casos, las exacerbaciones infecciosas en pacientes con EPOC severa son debidas a los MPPs que comúnmente causan exacerbaciones en la EPOC, independientemente de la colonización previa por *P. aeruginosa* y sugiere que el tratamiento antibiótico en los pacientes colonizados debe considerar otros microorganismos además de *P. aeruginosa*. El aumento de abundancia relativa de ciertos géneros se asoció a descensos en la abundancia de otros géneros que también incluyen MPPs, sin cambios significativos en la microbiota

comensal preexistente de las vías respiratorias y con el mismo patrón de comportamiento en pacientes colonizados y no colonizados por *P. aeruginosa*. Esto sugiere que en la exacerbación de la EPOC severa se produce una sustitución de los MPPs presentes por otros MPPs que se convierten en predominantes.

Los cambios durante las exacerbaciones detectados por pirosecuenciación, no se detectaron por cultivo tradicional en un tercio de los pacientes. Aunque el cultivo microbiológico es el *gold standard* para la identificación de colonización bronquial [156], tiene ciertas limitaciones. Un elevado número de microorganismos no crecen en los cultivos selectivos que se usan habitualmente en los laboratorios de microbiología, y las bacterias de crecimiento rápido pueden enmascarar el crecimiento de otras bacterias también importantes [103]. La amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr identifica la composición real del microbioma pulmonar y nos ayuda a entender la asociación entre los cambios en el microbioma y los diferentes estados de la enfermedad.

El uso del esputo en los estudios del microbioma bronquial presenta ciertas limitaciones a la hora de extrapolar los resultados al conjunto de las vías respiratorias. El esputo tiene la ventaja de ser una muestra que se obtiene fácilmente y de forma no invasiva y además, con guías que determinan las formas de obtención de la muestra y el control de calidad de la misma [157, 158]. Aunque el esputo es una muestra que puede presentar contaminación por la microbiota del tracto orofaríngeo y de la cavidad bucal, la composición del microbioma observada en nuestros pacientes fue similar a la hallada en otros estudios realizados en individuos sanos y en pacientes con EPOC que han examinado muestras de raspado bronquial y de BAL [112, 114]. Por tanto, podemos asumir que el esputo es una muestra representativa para el estudio del microbioma en el paciente con EPOC, con la ventaja adicional de que los resultados obtenidos con esta muestra se pueden comparar con los cultivos de esputo tradicionales.

Podemos concluir que en los pacientes con EPOC estable severa hay un microbioma bronquial complejo compuesto además por MPPs que no suelen aparecer en la población normal. En los pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, la comunidad bacteriana no muestra diferencias con respecto a los pacientes no colonizados durante

la estabilidad, excepto por la mayor abundancia esperada del género *Pseudomonas*. Cuando aparece una exacerbación, hay un cambio en la microbiota con la aparición de MPPs con un perfil similar al que aparece en los individuos con EPOC severa no colonizados. Todo esto sugiere que el tratamiento antibiótico administrado tras una exacerbación a los pacientes colonizados por *P. aeruginosa* no debería ser diferente al que se administra a los pacientes no colonizados. Sin embargo, esta estimación deberá ser confirmada en otras cohortes de pacientes.

El análisis del microbioma bronquial en pacientes con estadios iniciales y avanzados de la enfermedad, permite caracterizar los cambios que aparecen durante la progresión de la misma. Para el tercer trabajo, se seleccionaron pacientes con EPOC moderada y severa, de las categorías A y D de la nueva clasificación propuesta por GOLD [2]. Los pacientes de tipo A incluidos en el estudio se caracterizaban por tener una enfermedad moderada poco sintomática y baja frecuencia de exacerbación. Los pacientes de tipo D presentaban EPOC severa, sintomática y con exacerbaciones frecuentes.

En cuanto a la composición de la comunidad bacteriana, se observó la presencia de una microbiota compleja en los dos grupos de pacientes con EPOC estable. Los filos más prevalentes fueron *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, lo que está en concordancia con lo descrito en otros trabajos que han analizado el microbioma de los pacientes con EPOC [112, 115]. Sin embargo, en los pacientes moderados se encontró una mayor representación de los filos *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* y *SR1* respecto a los pacientes más severos. A nivel de género, también en concordancia con lo descrito en otros trabajos [112, 115], los más frecuentes incluyeron *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Prevotella*, *Rothia*, *Gemella*, *Fusobacterium* y *Neisseria*. No obstante, la distribución de la abundancia entre los dos grupos de pacientes fue diferente. En los pacientes con EPOC moderada, veinte géneros representaron hasta un 30% de la abundancia relativa del grupo, mientras que estos géneros representaron menos del 2% de la microbiota en el grupo de pacientes severos. Por último, a nivel de subgénero, las diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa favorecieron el grupo de los pacientes moderados en 30 microorganismos mientras que únicamente uno fue más abundante en los severos. Todas las diferencias detectadas en la abundancia relativa

de determinados OTUs se vieron reflejadas en el análisis de coordenadas principales, en el que se analiza la composición de la comunidad microbiana. Los pacientes moderados y severos se separaron claramente en dos grupos diferentes, lo que demuestra la presencia de comunidades bacterianas distintas, propias de cada conjunto de pacientes. La diversidad bacteriana fue claramente superior en los pacientes moderados, lo que está de acuerdo con los resultados de Erb-Downward y cols. [112] que también observaron una pérdida de diversidad en la microbiota de los pacientes con EPOC más severa. Sin embargo, estos resultados no se reproducían en el estudio de Pragman y cols. [116], que no encontraron diferencias en la diversidad bacteriana entre el microbioma bronquial de pacientes con EPOC moderada y severa. En este trabajo se analizaron muestras de BAL de pacientes con EPOC moderada, pacientes con EPOC severa y controles sanos. Estos autores encontraron que los pacientes con EPOC severa mostraban los niveles más altos de diversidad, seguido de los pacientes moderados y los controles sanos, diferencias que se veían influidas por la edad de los pacientes. La utilización de la nueva clasificación de la EPOC en el presente trabajo [2] facilita una mejor categorización de los pacientes, aumentando con ello la posibilidad de encontrar diferencias entre los subgrupos de EPOC, que tal vez no resultaran evidentes usando criterios de clasificación con menor precisión.

Por otro lado, las diferencias observadas en este estudio podrían estar relacionadas con el uso de esputo como muestra de secreción respiratoria. Las muestras de esputo se consiguen fácilmente y de forma no invasiva, y las guías para su obtención y procesamiento incluyen criterios validados de calidad [157, 158]. En su estudio, Pragman y cols. [116] analizaron muestras de BAL, que han mostrado claras diferencias en la composición microbiana al ser comparadas con el esputo de los mismos pacientes [119]. Las muestras de BAL y las biopsias bronquiales sí han mostrado equivalencia, ya que analizan un mismo territorio bronquial, aunque sus resultados no deben tomarse como representativos del conjunto del pulmón, ya que un estudio en el que se tomaron muestras de diferentes bronquios del mismo paciente encontraron diferencias significativas en la composición microbiológica [112].

La microbiota característica de la vía aérea inferior en el individuo sano refleja una continuidad desde la vía respiratoria superior, facilitada por la microaspiración

[114]. Esta continuidad podría estar alterada en los pacientes con EPOC, que presentan un microbioma bronquial específico, con mayor abundancia de *H. influenzae*, un MPP que no se encuentra en el tracto orofaríngeo de los individuos sanos [115]. Se ha descrito en los pacientes con EPOC una composición microbiana característica, con abundancia elevada de los géneros *Haemophilus* y *Moraxella* [115], que forman parte del filo *Proteobacteria* que incluye un amplio espectro de MPPs implicados en infecciones del sistema respiratorio. Esta microbiota característica parece que evolucionaría con el progreso de la enfermedad, de forma que los individuos con enfermedad moderada presentarían una microbiota más similar a los individuos sanos mientras que los individuos con una enfermedad más severa tendrían una microbiota diferenciada. De hecho, en un reciente trabajo publicado por Molyneaux y cols. [159] no encontraron diferencias en el microbioma bronquial entre su cohorte de pacientes con EPOC moderada y un grupo de controles sanos, por lo que la severidad de la enfermedad podría ser un factor importante para esta alteración del microbioma.

La identificación de un grupo de microorganismos que conformarían el núcleo del microbioma bronquial ha creado cierta controversia. Se puede definir el núcleo del microbioma de un determinado territorio anatómico, como el conjunto de microorganismos que aparecen en el 100% de los individuos estudiados [160]. Sin embargo, esta aproximación es muy exigente, y algunos autores aceptan la presencia en un 95% de los casos como criterio de identificación. El núcleo del microbioma estaría formado por menos del 10% de los OTUs presentes en ese determinado sitio, pero se ha observado una gran variabilidad entre individuos en cuanto a la abundancia de los OTUs que conforman el núcleo del microbioma de una determinada zona, y especialmente, entre los núcleos de diferentes territorios anatómicos [160].

En este trabajo se definió el núcleo del microbioma bronquial de cada grupo de pacientes con EPOC como aquellos OTUs que aparecen en el 100% de los pacientes. Este núcleo incluyó microorganismos del género *Rothia*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* y *Veillonella*, que forman parte también del microbioma de los individuos sanos [112, 115]. Este núcleo fue independiente de la severidad de la enfermedad, y representó el 5% de los OTUs detectados en los pacientes.

Por tanto, los resultados de este estudio confirman la presencia de un

microbioma bronquial diverso en los pacientes con EPOC sin signos de infección bronquial. Además, respaldan la hipótesis de que en los pacientes con EPOC severa hay una pérdida de diversidad bacteriana, con la sustitución de un amplio rango de bacterias presentes en los pacientes moderados por otros MPPs. Por tanto, la evolución de la EPOC estaría relacionada con un cambio en el microbioma bronquial, con pérdida de la microbiota comensal en los pacientes con EPOC más severa.

Los trabajos que han formado parte de esta tesis ponen de manifiesto el papel de las bacterias en la EPOC. Tanto en el primer trabajo, en el que se estudió el efecto de *H. influenzae* a nivel de respuesta inmune y su interacción con la MMP-9, como en los otros dos estudios del microbioma en pacientes con EPOC moderada o severa han demostrado que la interacción entre las bacterias y el huésped puede ser muy importante para el progreso de la enfermedad. Se muestra que la colonización bacteriana se asocia a una respuesta inflamatoria bronquial, sin modificar la flora acompañante ni la microbiología de la exacerbación. La microbiota, sin embargo, reduce su diversidad cuando la enfermedad es severa.

CONCLUSIONES

El primer estudio analizó la relación entre colonización por *H. influenzae* e inflamación bronquial en pacientes con EPOC estables y demuestra:

- Los pacientes con EPOC en estabilidad colonizados por *H. influenzae* tienen niveles más bajos de IgA específica contra este microorganismo que los pacientes no colonizados. Esta observación sugiere que defectos en el sistema inmune local en el árbol bronquial, propios del sujeto o inducidos por la misma colonización, pueden facilitar la presencia de este microorganismo en la vía aérea, como colonización crónica o recurrente.
- Los pacientes con EPOC en estabilidad colonizados por *H. influenzae* tienen concentraciones más altas de MMP-9 activa que los pacientes no colonizados, sin incrementar los niveles de su inhibidor TIMP-1. Esta estimulación de la actividad de la MMP-9, en caso de mantenerse en el tiempo, puede asociarse a daño estructural en la vía aérea del paciente con EPOC.

El segundo estudio examinó las diferencias entre el microbioma bronquial de los pacientes con EPOC severa colonizados por *P. aeruginosa* o no colonizados, tanto en estabilidad como cuando aparece una exacerbación y demuestra que:

- El microbioma bronquial de los pacientes con EPOC severa en estabilidad incluye géneros con conocidos MPPs.
- El microbioma bronquial de los pacientes con EPOC severa colonizados por *P. aeruginosa* en estabilidad únicamente es diferente del microbioma de los pacientes no colonizados en una mayor abundancia de microorganismos del género *Pseudomonas*.
- No existen diferencias en el microbioma bronquial entre los pacientes con EPOC severa colonizados y no colonizados por *P. aeruginosa* durante las exacerbaciones, lo que permite asumir que los MPPs que causan exacerbación

en la EPOC severa son los mismos en pacientes colonizados y no colonizados.

El tercer estudio evaluó los cambios en el microbioma bronquial en los pacientes con EPOC moderada y severa y demuestra que:

- Los pacientes con EPOC severa tienen un microbioma bronquial característico, con una sobrerrepresentación del filo *Proteobacteria*, que incluye los MPPs más relacionados con la enfermedad.
- Los pacientes con EPOC severa muestran una pérdida de diversidad microbiana, con una sustitución de la microbiota normal por otra con mayor abundancia de MPPs.

REFERENCIAS

1. Grupo de Trabajo de GESEPOC: **[Moving towards a new focus on COPD. The Spanish COPD Guidelines (GESEPOC)]**. *Arch Bronconeumol* 2011, **47**:379–381.
2. Available from: <http://www.goldcopd.org/>.: **From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2013**. .
3. Zwar NA, Marks GB, Hermiz O, Middleton S, Comino EJ, Hasan I, Vagholkar S, Wilson SF: **Predictors of accuracy of diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease in general practice**. *Med J Aust* 2011, **195**:168–171.
4. Decramer M, Janssens W, Miravittles M: **Chronic obstructive pulmonary disease**. *Lancet* 2012, **379**:1341–1351.
5. Burrows B, Earle RH: **Prediction of survival in patients with chronic airway obstruction**. *Am Rev Respir Dis* 1969, **99**:865–871.
6. 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.
7. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen W-H, Kline Leidy N: **Development and first validation of the COPD Assessment Test**. *Eur Respir J* 2009, **34**:648–654.
8. ANDERSON DO, FERRIS BG Jr: **Role of tobacco smoking in the causation of chronic respiratory disease**. *N Engl J Med* 1962, **267**:787–794.
9. OSWALD NC, MEDVEI VC: **Chronic bronchitis; the effect of cigarette-smoking**. *Lancet* 1955, **269**:843–844.
10. Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J: **Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population**. *Thorax* 2006, **61**:935–939.
11. Miravittles M, Soriano JB, García-Río F, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sanchez G, Sobradillo V, Ancochea J: **Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities**. *Thorax* 2009, **64**:863–868.
12. Ho SY, Lam TH, Chung SF, Lam TP: **Cross-sectional and prospective associations between passive smoking and respiratory symptoms at the workplace**. *Ann Epidemiol* 2007, **17**:126–131.
13. Jaakkola MS, Jaakkola JJK: **Effects of environmental tobacco smoke on the respiratory health of adults**. *Scand J Work Environ Health* 2002, **28 Suppl 2**:52–70.
14. Larsson ML, Loit HM, Meren M, Pölluste J, Magnusson A, Larsson K, Lundbäck B: **Passive smoking and respiratory symptoms in the FinEsS Study**. *Eur Respir J* 2003, **21**:672–676.

15. Yin P, Jiang CQ, Cheng KK, Lam TH, Lam KH, Miller MR, Zhang WS, Thomas GN, Adab P: **Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study.** *Lancet* 2007, **370**:751–757.
16. Salvi SS, Barnes PJ: **Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers.** *Lancet* 2009, **374**:733–743.
17. Hu G, Zhou Y, Tian J, Yao W, Li J, Li B, Ran P: **Risk of COPD from exposure to biomass smoke: a metaanalysis.** *Chest* 2010, **138**:20–31.
18. Rushton L: **Occupational causes of chronic obstructive pulmonary disease.** *Rev Environ Health* 2007, **22**:195–212.
19. Stoller JK, Aboussouan LS: **Alpha1-antitrypsin deficiency.** *Lancet* 2005, **365**:2225–2236.
20. National Heart, Lung, and Blood Institute: **2012 NHLBI Morbidity and Mortality Chart Book.** .
21. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC: **Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000.** *Respir Care* 2002, **47**:1184–1199.
22. Bousquet J, Kiley J, Bateman ED, Viegi G, Cruz AA, Khaltaev N, Ait Khaled N, Baena-Cagnani CE, Barreto ML, Billo N, Canonica GW, Carlsen K-H, Chavannes N, Chuchalin A, Drazen J, Fabbri LM, Gerbase MW, Humbert M, Joos G, Masjedi MR, Makino S, Rabe K, To T, Zhi L: **Prioritised research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases.** *Eur Respir J* 2010, **36**:995–1001.
23. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM: **Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis.** *Eur Respir J* 2006, **28**:523–532.
24. Atsou K, Chouaid C, Hejblum G: **Variability of the chronic obstructive pulmonary disease key epidemiological data in Europe: systematic review.** *BMC Med* 2011, **9**:7.
25. Soriano JB, Ancochea J, Miravitlles M, García-Río F, Duran-Tauleria E, Muñoz L, Jiménez-Ruiz CA, Masa JF, Viejo JL, Villasante C, Fernández-Fau L, Sánchez G, Sobradillo-Peña V: **Recent trends in COPD prevalence in Spain: a repeated cross-sectional survey 1997-2007.** *Eur Respir J* 2010, **36**:758–765.
26. **WHO | World Health Statistics 2008**
[<http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/>]
27. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR: **New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease.** *Lancet* 2011, **378**:1015–1026.
28. Hogg JC: **Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Lancet* 2004, **364**:709–721.

-
29. **Emphysema Guide: Causes, Symptoms and Treatment Options** [<http://www.drugs.com/health-guide/emphysema.html>]
30. O'Donnell AE: **Bronchiectasis**. *Chest* 2008, **134**:815–823.
31. O'Donnell AE: **Bronchiectasis in patients with COPD: a distinct COPD phenotype?** *Chest* 2011, **140**:1107–1108.
32. Martínez-García M-A, de la Rosa Carrillo D, Soler-Cataluña J-J, Donat-Sanz Y, Serra PC, Lerma MA, Ballestín J, Sánchez IV, Selma Ferrer MJ, Dalfo AR, Valdecillos MB: **Prognostic value of bronchiectasis in patients with moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease**. *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **187**:823–831.
33. Vendrell M, de Gracia J, Oliveira C, Martínez MA, Girón R, Máiz L, Cantón R, Coll R, Escribano A, Solé A: **[Diagnosis and treatment of bronchiectasis. Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery]**. *Arch Bronconeumol* 2008, **44**:629–640.
34. Hu J, Van den Steen PE, Sang Q-XA, Opdenakker G: **Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases**. *Nat Rev Drug Discov* 2007, **6**:480–498.
35. Shiomi T, Okada Y, Foronjy R, Schiltz J, Jaenish R, Krane S, D'Armiento J: **Emphysematous changes are caused by degradation of type III collagen in transgenic mice expressing MMP-1**. *Exp Lung Res* 2003, **29**:1–15.
36. Rosenblum G, Van den Steen PE, Cohen SR, Grossmann JG, Frenkel J, Sertchook R, Slack N, Strange RW, Opdenakker G, Sagi I: **Insights into the Structure and Domain Flexibility of Full-Length Pro-Matrix Metalloproteinase-9/Gelatinase B**. *Structure* 2007, **15**:1227–1236.
37. Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, D'arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM: **Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients**. *Thorax* 1997, **52**:502–506.
38. Cataldo D, Munaut C, Noël A, Frankenne F, Bartsch P, Foidart JM, Louis R: **MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease**. *Int Arch Allergy Immunol* 2000, **123**:259–267.
39. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Konttinen YT: **Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema**. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 1998, **78**:1077–1087.
40. Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE: **Sputum matrix metalloproteases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma**. *Respir Med* 2005, **99**:703–710.
41. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R: **Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloprotease-1, and their molar ratio in patients with chronic**
-

obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med* 2003, **97**:634–639.

42. Lagente V, Boichot E: **Role of matrix metalloproteinases in the inflammatory process of respiratory diseases.** *J Mol Cell Cardiol* 2010, **48**:440–444.

43. Sethi S, Murphy TF: **Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease.** *N Engl J Med* 2008, **359**:2355–2365.

44. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS: **Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**:991–998.

45. Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA: **Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis.** *Am J Med* 2000, **109**:288–295.

46. Marin A, Monsó E, Garcia-Nuñez M, Sauleda J, Noguera A, Pons J, Agustí A, Morera J: **Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD.** *Eur Respir J* 2010, **35**:295–302.

47. Matkovic Z, Miravittles M: **Chronic bronchial infection in COPD. Is there an infective phenotype?** *Respir Med* 2013, **107**:10–22.

48. Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D: **Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD.** *Eur Respir J* 2004, **23**:685–691.

49. Miravittles M, Marín A, Monsó E, Vilà S, de la Roza C, Hervás R, Esquinas C, García M, Millares L, Morera J, Torres A: **Colour of sputum is a marker for bacterial colonisation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Respir Res* 2010, **11**:58.

50. Patel IS, Seemungal TAR, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA: **Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations.** *Thorax* 2002, **57**:759–764.

51. Rosell A, Monsó E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, Zalacaín R, Morera J, Torres A: **Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Arch Intern Med* 2005, **165**:891–897.

52. Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A: **Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J* 1999, **14**:1015–1022.

53. Monsó E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J, Ausina V: **Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **152**(4 Pt 1):1316–1320.

-
54. 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**:1137–1144.
55. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barrón J, Achótegui V, Pijoan JI, Llorente JL: **Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J* 1999, **13**:343–348.
56. Weinreich UM, Korsgaard J: **Bacterial colonisation of lower airways in health and chronic lung disease.** *Clin Respir J* 2008, **2**:116–122.
57. Monsó E, Rosell A, Bonet G, Manterola J, Cardona PJ, Ruiz J, Morera J: **Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis.** *Eur Respir J* 1999, **13**:338–342.
58. Garmendia J, Morey P, Bengoechea JA: **Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions.** *Eur Respir J* 2012, **39**:467–477.
59. King P: **Haemophilus influenzae and the lung (Haemophilus and the lung).** *Clin Transl Med* 2012, **1**:10.
60. Rao VK, Krasan GP, Hendrixson DR, Dawid S, St Geme JW 3rd: **Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable Haemophilus influenzae.** *FEMS Microbiol Rev* 1999, **23**:99–129.
61. Denny FW: **Effect of a toxin produced by Haemophilus influenzae on ciliated respiratory epithelium.** *J Infect Dis* 1974, **129**:93–100.
62. Janson H, Carl n B, Cervin A, Forsgren A, Magnusdottir AB, Lindberg S, Runer T: **Effects on the ciliated epithelium of protein D-producing and -nonproducing nontypeable Haemophilus influenzae in nasopharyngeal tissue cultures.** *J Infect Dis* 1999, **180**:737–746.
63. O'Neill JM, St. Geme III JW, Cutter D, Adderson EE, Anyanwu J, Jacobs RF, Schutze GE: **Invasive Disease Due to Nontypeable Haemophilus influenzae among Children in Arkansas.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:3064–3069.
64. Berenson CS, Murphy TF, Wrona CT, Sethi S: **Outer membrane protein P6 of nontypeable Haemophilus influenzae is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines.** *Infect Immun* 2005, **73**:2728–2735.
65. Balows A, Hausler WJ, Lennette EH, Shadomy: *Manual de microbiología clínica.* Buenos Aires [etc.]: Médica Panamericana; 1987.
66. Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K: **A dynamic and intricate regulatory network determines Pseudomonas aeruginosa virulence.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:1–20.
67. Murphy TF: **The many faces of Pseudomonas aeruginosa in chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2008, **47**:1534–1536.
-

68. Parameswaran GI, Sethi S: **Pseudomonas infection in chronic obstructive pulmonary disease.** *Future Microbiol* 2012, **7**:1129–1132.
69. Pilette C, Durham SR, Vaerman J-P, Sibille Y: **Mucosal immunity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a role for immunoglobulin A?** *Proc Am Thorac Soc* 2004, **1**:125–135.
70. Brandtzaeg P: **Humoral immune response patterns of human mucosae: induction and relation to bacterial respiratory tract infections.** *J Infect Dis* 1992, **165 Suppl 1**:S167–176.
71. Brandtzaeg P: **Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense.** *Front Immunol* 2013, **4**:222.
72. Brandtzaeg P: **Secretory immunity with special reference to the oral cavity.** *J Oral Microbiol* 2013, **5**.
73. Corthésy B: **Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis.** *Autoimmun Rev* 2013, **12**:661–665.
74. Corthésy B: **Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces.** *Front Immunol* 2013, **4**:185.
75. Merrill WW, Naegel GP, Olchowski JJ, Reynolds HY: **Immunoglobulin G subclass proteins in serum and lavage fluid of normal subjects. Quantitation and comparison with immunoglobulins A and E.** *Am Rev Respir Dis* 1985, **131**:584–587.
76. Atış S, Tutluoğlu B, Salepçi B, Ocal Z: **Serum IgA and secretory IgA levels in bronchial lavages from patients with a variety of respiratory diseases.** *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001, **11**:112–117.
77. Qvarfordt I, Riise GC, Andersson BA, Larsson S: **IgG subclasses in smokers with chronic bronchitis and recurrent exacerbations.** *Thorax* 2001, **56**:445–449.
78. Von Hertzen L, Alakärppä H, Koskinen R, Liippo K, Surcel HM, Leinonen M, Saikku P: **Chlamydia pneumoniae infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Epidemiol Infect* 1997, **118**:155–164.
79. Miravittles M, Ferrer M, Pont A, Zalacain R, Alvarez-Sala JL, Masa F, Vereá H, Murio C, Ros F, Vidal R, IMPAC Study Group: **Effect of exacerbations on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a 2 year follow up study.** *Thorax* 2004, **59**:387–395.
80. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, Fabbri LM, Johnston SL: **Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**:1114–1121.
81. Stockley RA, O'Brien C, Pye A, Hill SL: **Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD.** *Chest* 2000, **117**:1638–1645.

-
82. Soler N, Agustí C, Angrill J, Puig De la Bellacasa J, Torres A: **Bronchoscopic validation of the significance of sputum purulence in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.** *Thorax* 2007, **62**:29–35.
83. Colwell RR, Brayton P, Herrington D, Tall B, Huq A, Levine MM: **Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine.** *World J Microbiol Biotechnol* 1996, **12**:28–31.
84. Colwell RR: **Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy.** *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother* 2000, **6**:121–125.
85. Doenges JL: **Spirochetes in Gastric Glands of *Macacus rhesus* and Humans without Definite History of Related Disease.** *Exp Biol Med* 1938, **38**:536–538.
86. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ: **Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*.** *Med J Aust* 1985, **142**:436–439.
87. Marshall BJ, McGeachie DB, Rogers PA, Glancy RJ: **Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease.** *Med J Aust* 1985, **142**:439–444.
88. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH: **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.** *Microbiol Rev* 1995, **59**:143–169.
89. Handelsman J: **Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms.** *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2004, **68**:669–685.
90. Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR: **Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences.** *Appl Environ Microbiol* 1985, **49**:1379–1384.
91. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR: **Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**:6955–6959.
92. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:5463–5467.
93. Mardis ER: **The impact of next-generation sequencing technology on genetics.** *Trends Genet TIG* 2008, **24**:133–141.
94. Metzker ML: **Sequencing technologies - the next generation.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**:31–46.
95. Mardis ER: **A decade's perspective on DNA sequencing technology.** *Nature* 2011, **470**:198–203.
96. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, Shi L: **Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics.** *Expert Rev Mol Diagn* 2011, **11**:333–343.
-

97. **Tech Summary: ABI's SOLiD (Seq. by Oligo Ligation/Detection), UPDATED for v2.0 - SEQanswers** [<http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=10>]
98. Sasson A, Michael TP: **Filtering error from SOLiD Output**. *Bioinforma Oxf Engl* 2010, **26**:849–850.
99. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, Simons JF, Marran D, Myers JW, Davidson JF, Branting A, Nobile JR, Puc BP, Light D, Clark TA, Huber M, Branciforte JT, Stoner IB, Cawley SE, Lyons M, Fu Y, Homer N, Sedova M, Miao X, Reed B, et al.: **An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing**. *Nature* 2011, **475**:348–352.
100. **RNA-seq Using Next Generation Sequencing** [<http://www.labome.com/method/RNA-seq-Using-Next-Generation-Sequencing.html>]
101. Cox MJ, Cookson WOCM, Moffatt MF: **Sequencing the human microbiome in health and disease**. *Hum Mol Genet* 2013.
102. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J: **Metagenomic pyrosequencing and microbial identification**. *Clin Chem* 2009, **55**:856–866.
103. Morgan XC, Huttenhower C: **Chapter 12: Human microbiome analysis**. *PLoS Comput Biol* 2012, **8**:e1002808.
104. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM: **The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis**. *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(Database issue):D141–145.
105. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, Hugenholtz P: **An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea**. *ISME J* 2012, **6**:610–618.
106. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO: **The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools**. *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(Database issue):D590–596.
107. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R: **QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data**. *Nat Methods* 2010, **7**:335–336.
108. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF: **Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-**

supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:7537–7541.

109. Frank DN, Zhu W, Sartor RB, Li E: **Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses.** *Trends Microbiol* 2011, **19**:427–434.

110. Sekirov I, Finlay BB: **The role of the intestinal microbiota in enteric infection.** *J Physiol* 2009, **587**(Pt 17):4159–4167.

111. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB: **The role of the bacterial microbiome in lung disease.** *Expert Rev Respir Med* 2013, **7**:245–257.

112. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB: **Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD.** *PLoS One* 2011, **6**:e16384.

113. Charlson ES, Bittinger K, Chen J, Diamond JM, Li H, Collman RG, Bushman FD: **Assessing bacterial populations in the lung by replicate analysis of samples from the upper and lower respiratory tracts.** *PLoS One* 2012, **7**:e42786.

114. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG: **Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract.** *Am J Respir Crit Care Med* 2011, **184**:957–963.

115. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WOC: **Disordered microbial communities in asthmatic airways.** *PLoS One* 2010, **5**:e8578.

116. Pragman AA, Kim HB, Reilly CS, Wendt C, Isaacson RE: **The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease.** *PLoS One* 2012, **7**:e47305.

117. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV, Cooper J, Sin DD, Mohn WW, Hogg JC: **The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2012, **185**:1073–1080.

118. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI: **Human gut microbiome viewed across age and geography.** *Nature* 2012, **486**:222–227.

119. Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, Mira A: **Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**:3562–3568.

120. Huang YJ, Kim E, Cox MJ, Brodie EL, Brown R, Wiener-Kronish JP, Lynch SV: **A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations.** *Omic J Integr Biol* 2010, **14**:9–59.

121. Polosukhin VV, Cates JM, Lawson WE, Zaynagetdinov R, Milstone AP, Massion PP, Ocak S, Ware LB, Lee JW, Bowler RP, Kononov AV, Randell SH, Blackwell TS: **Bronchial secretory immunoglobulin a deficiency correlates with airway inflammation and progression of chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2011, **184**:317–327.
122. Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeken E, Decaestecker C, De Paepe K, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y: **Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**:185–194.
123. Mansa B, Kilian M: **Retained antigen-binding activity of Fab alpha fragments of human monoclonal immunoglobulin A1 (IgA1) cleaved by IgA1 protease.** *Infect Immun* 1986, **52**:171–174.
124. Murphy TF, Lesse AJ, Kirkham C, Zhong H, Sethi S, Munson RS Jr: **A clonal group of nontypeable Haemophilus influenzae with two IgA proteases is adapted to infection in chronic obstructive pulmonary disease.** *PloS One* 2011, **6**:e25923.
125. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ: **Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **153**:530–534.
126. Marin A, Garcia-Aymerich J, Sauleda J, Belda J, Millares L, García-Núñez M, Serra I, Benet M, Agustí A, Antó JM, Monsó E, PAC-COPD Study Group: **Effect of bronchial colonisation on airway and systemic inflammation in stable COPD.** *COPD* 2012, **9**:121–130.
127. Russell REK, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ: **Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, **26**:602–609.
128. Gueders MM, Foidart J-M, Noel A, Cataldo DD: **Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases.** *Eur J Pharmacol* 2006, **533**:133–144.
129. Churg A, Zhou S, Wright JL: **Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: Matrix metalloproteinases in COPD.** *Eur Respir J* 2012, **39**:197–209.
130. Ilumets H, Ryttilä P, Demedts I, Brusselle GG, Sovijärvi A, Myllärniemi M, Sorsa T, Kinnula VL: **Matrix metalloproteinases -8, -9 and -12 in smokers and patients with stage 0 COPD.** *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007, **2**:369–379.
131. Vernooij JHJ, Lindeman JHN, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EFM: **Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD.** *Chest* 2004, **126**:1802–1810.

-
132. Louhelainen N, Stark H, Mazur W, Ryttilä P, Djukanovic R, Kinnula VL: **Elevation of sputum matrix metalloproteinase-9 persists up to 6 months after smoking cessation: a research study.** *BMC Pulm Med* 2010, **10**:13.
133. Lowrey GE, Henderson N, Blakey JD, Corne JM, Johnson SR: **MMP-9 protein level does not reflect overall MMP activity in the airways of patients with COPD.** *Respir Med* 2008, **102**:845–851.
134. Asano K, Shikama Y, Shoji N, Hirano K, Suzaki H, Nakajima H: **Tiotropium bromide inhibits TGF- β -induced MMP production from lung fibroblasts by interfering with Smad and MAPK pathways in vitro.** *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2010, **5**:277–286.
135. Baines KJ, Simpson JL, Gibson PG: **Innate immune responses are increased in chronic obstructive pulmonary disease.** *PloS One* 2011, **6**:e18426.
136. Van Diemen CC, Postma DS, Siedlinski M, Blokstra A, Smit HA, Boezen HM: **Genetic variation in TIMP1 but not MMPs predict excess FEV1 decline in two general population-based cohorts.** *Respir Res* 2011, **12**:57.
137. Garcia-Vidal C, Almagro P, Romaní 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.
138. Soler N, Torres A, Ewig S, Gonzalez J, Celis R, El-Ebiary M, Hernandez C, Rodriguez-Roisin R: **Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, **157**(5 Pt 1):1498–1505.
139. Eller J, Ede A, Schaberg T, Niederman MS, Mauch H, Lode H: **Infective exacerbations of chronic bronchitis: relation between bacteriologic etiology and lung function.** *Chest* 1998, **113**:1542–1548.
140. Lieberman D, Lieberman D: **Pseudomonas infections in patients with COPD: epidemiology and management.** *Am J Respir Med Drugs Devices Interv* 2003, **2**:459–468.
141. Miravittles M, Espinosa C, Fernández-Laso E, Martos JA, Maldonado JA, Gallego M: **Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. Study Group of Bacterial Infection in COPD.** *Chest* 1999, **116**:40–46.
142. 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.
143. 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.
-

144. Martínez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martinez JL: **Chronic Pseudomonas aeruginosa infection in chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2008, **47**:1526–1533.
145. Pomares X, Montón C, Espasa M, Casabon J, Monsó E, Gallego M: **Long-term azithromycin therapy in patients with severe COPD and repeated exacerbations.** *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011, **6**:449–456.
146. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Huchon G, Ieven M, Leven M, Ortqvist A, Schaberg T, Torres A, van der Heijden G, Verheij TJM, European Respiratory Society, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: **Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections.** *Eur Respir J* 2005, **26**:1138–1180.
147. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, Flores SC, Fontenot AP, Ghedin E, Huang L, Jablonski K, Kleerup E, Lynch SV, Sodergren E, Twigg H, Young VB, Bassis CM, Venkataraman A, Schmidt TM, Weinstock GM, Lung HIV Microbiome Project: **Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers.** *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **187**:1067–1075.
148. Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC: **The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research.** *Proc Am Thorac Soc* 2007, **4**:512–521.
149. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J: **Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach.** *Gut* 2006, **55**:205–211.
150. Sartor RB: **Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:16413–16414.
151. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW: **Longitudinal assessment of Pseudomonas aeruginosa in young children with cystic fibrosis.** *J Infect Dis* 2001, **183**:444–452.
152. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL: **Pseudomonas aeruginosa and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis.** *Pediatr Pulmonol* 2002, **34**:91–100.
153. West SEH, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, Splaingard MJ, Farrell PM: **Respiratory infections with Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors.** *JAMA J Am Med Assoc* 2002, **287**:2958–2967.
154. Dal Negro R, Micheletto C, Tognella S, Visconti M, Turati C: **Tobramycin Nebulizer Solution in severe COPD patients colonized with Pseudomonas aeruginosa: effects on bronchial inflammation.** *Adv Ther* 2008, **25**:1019–1030.

155. Orriols R, Roig J, Ferrer J, Sampol G, Rosell A, Ferrer A, Vallano A: **Inhaled antibiotic therapy in non-cystic fibrosis patients with bronchiectasis and chronic bronchial infection by *Pseudomonas aeruginosa***. *Respir Med* 1999, **93**:476–480.
156. Han MK, Huang YJ, Lipuma JJ, Boushey HA, Boucher RC, Cookson WO, Curtis JL, Erb-Downward J, Lynch SV, Sethi S, Toews GB, Young VB, Wolfgang MC, Huffnagle GB, Martinez FJ: **Significance of the microbiome in obstructive lung disease**. *Thorax* 2012, **67**:456–463.
157. Murray PR, Washington JA: **Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum**. *Mayo Clin Proc Mayo Clin* 1975, **50**:339–344.
158. Van Scoy RE: **Bacterial sputum cultures. A clinician's viewpoint**. *Mayo Clin Proc Mayo Clin* 1977, **52**:39–41.
159. Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, Footitt J, Willis-Owen SAG, Homola D, Trujillo-Torralbo M-B, Elkin S, Kon OM, Cookson WOC, Moffatt MF, Johnston SL: **Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease**. *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **188**:1224–1231.
160. Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor AA: **A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters**. *PLoS One* 2012, **7**:e34242.

ANEXO I

Compendio de publicaciones

RESEARCH

Open Access

Specific IgA and metalloproteinase activity in bronchial secretions from stable chronic obstructive pulmonary disease patients colonized by *Haemophilus influenzae*

Laura Millares^{1,2,3,4*}, Alicia Marin^{2,3,4}, Judith Garcia-Aymerich^{5,6,7,8}, Jaume Sauleda^{2,9}, José Belda¹⁰, Eduard Monsó^{2,3,11*} and On behalf of the PAC-COPD Study Group

Abstract

Background: *Haemophilus influenzae* is the most common colonizing bacteria of the bronchial tree in chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and positive cultures for this potentially pathogenic microorganism (PPM) has been associated with local inflammation changes that may influence the relationships between *H. influenzae* and the bronchial mucosa.

Methods: A cross-sectional analysis of stable COPD patients enrolled in the Phenotype and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (PAC-COPD) Study, focusing on bronchial colonization by *H. influenzae*, was performed. Specific IgA against the PPM was measured by optical density, and metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) using ELISA in sputum samples. Levels in patients colonized by *H. influenzae* and non-colonized patients were compared.

Results: Sputum supernatant for the measurement of specific IgA against *H. influenzae* was available from 54 stable COPD patients, who showed levels of specific IgA significantly lower in colonized (n=21) than in non-colonized patients (n=33) (15 [4-37] versus 31 [10-75], p=0.033, Mann-Whitney U test). Proenzyme MMP-9 was measured in 44 patients, and it was higher in colonized (n=12, 1903 [1488-6699] ng/ml) than in non-colonized patients (n=32, 639 [373-972] ng/ml) (p<0.001, Mann-Whitney U test). Active form of MMP-9 was also higher in colonized (126 [25-277] ng/ml) than in non-colonized patients (39 [14-68] ng/ml) (p=0.021, Mann-Whitney U test), and the molar ratio between proenzyme MMP-9 and TIMP-1 was above 1 (2.1 [0.1-12.5]) in colonized patients, significantly higher than the ratio found in non-colonized patients (0.2 [0.08-0.5]) (p=0.030, Mann-Whitney U test).

Conclusions: Clinically stable COPD patients colonized by *H. influenzae* had lower levels of specific IgA against the microorganism and higher values of the active form of MMP-9 in their sputum supernatant than non-colonized patients. Bronchial colonization by *H. influenzae* may cause structural changes in the extracellular matrix through a defective defense and the production of active metalloproteinases.

Keywords: Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), *Haemophilus influenzae*, Secretory IgA, Metalloproteinase-9 (MMP-9), Tissue-inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)

* Correspondence: lmillares@tauli.cat; emonso@tauli.cat

¹Fundació Parc Taulí, Sabadell/Badalona, Spain

²CIBER de Enfermedades Respiratorias, CIBERES, Bunyola, Spain

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

Background

Potential pathogenic microorganisms (PPMs) colonize the bronchial tree of COPD patients and are found in the bronchial secretions of one third of adults with stable COPD, a rate that increases with the worsening of airflow obstruction [1]. *H. influenzae* is the most common colonizing bacteria isolated from these patients, and is also frequently recovered when exacerbation symptoms appear [2]. This PPM is able to adapt to changing environments through gene expression changes [3-5], some of which modify its virulence [6,7].

Both microorganism and host factors determine the outcome of the acquisition of a *H. influenzae* strain by the bronchial tree [8]. The bronchial mucosa is protected by a specialized immune system focused on the prevention of colonization and infection by PPMs, being antibodies the first line of this defense. IgA is the principal immunoglobulin produced in the bronchial tissue and a key element in this mechanism [9,10], with a major role in host defenses through inhibition of microbial adherence, toxin inactivation and promotion of humoral immunity [11]. The protection of bronchial mucosa from *H. influenzae* is partly mediated by immune exclusion [12], an essentially mechanical process in which secretory IgA (sIgA) agglutinates bacteria allowing the entrapment of the created bacterial complexes in mucus, which are expelled through mucociliary clearance. Under certain conditions *H. influenzae* may produce specific enzymes that cleave human IgA1, a subclass of bronchial IgA, separating the antigen recognition fragments of the immunoglobulin from its constant region and inactivating its protective role [13-15]. This direct effect of the proteases produced by *H. influenzae* on the levels of IgA may be clinically significant in the pathogenesis of COPD in colonized and infected patients.

The presence of *H. influenzae* in the bronchial tree of stable COPD patients is associated with an inflammatory response [16]. In colonized patients an imbalance between endogenous proteinases and proteinase inhibitors may be found that interferes with normal tissue function and repair [17]. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of Ca^{2+} -activated, Zn^{2+} -dependent proteases which are secreted by a wide variety of cells and are capable of degrading all components of the extracellular matrix [18]. Their activity is physiologically controlled by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), but in pathological conditions a switch in MMP production and activity may occur, which may lead to abnormal tissue destruction [19]. MMPs are thought to participate in the excessive collagenolytic and elastolytic activity found in COPD, as suggested by the high levels in lung tissue and induced sputum of patients with this disease [20-22]. Among the MMP family, MMP-9 is responsible for tissue repair and remodeling through the degradation of basement membrane type IV collagen and other matrix proteins. TIMP-1

is the major endogenous inhibitor of both MMP-8 and MMP-9, and high levels of this protein have been found in COPD [23].

With the hypothesis that in stable COPD bronchial colonization by *H. influenzae* may be related to an impaired local specific immunoglobulin response and to an imbalance between MMP-9 and TIMP-1 levels in bronchial secretions, we carried out a cross-sectional analysis of specific IgA against *H. influenzae* and metalloproteinase activity in sputum samples recovered from patients included in the PAC-COPD Study. Specific IgA and concentrations of the MMP-9, both total and active, and its inhibitor TIMP-1 were measured in sputum supernatant recovered from stable COPD patients colonized and non-colonized by *H. influenzae*. The PAC-COPD Study comprises patients who had a first admission for COPD exacerbation and who were examined later after the stabilization of the disease.

Methods

Design and participants

This cross-sectional analysis of the relationships between bronchial colonization by *H. influenzae* in COPD, local production of specific IgA against this PPM and metalloproteinase activity is part of the population-based Phenotype and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (PAC-COPD) Study. The PAC-COPD Study focus on patients who are in a moderate stage of their disease and had not required repeated admissions when examined, and with this purpose enrolled 342 COPD patients hospitalized for the first time for an exacerbation of their disease in nine teaching hospitals in Spain, who were evaluated later when they were clinically stable. The recruitment process and the definitions of COPD, exacerbation and first admission in the PAC-COPD Study have been reported elsewhere [24,25]. Stable patients from the PAC-COPD Study who expectorated samples with low squamous cell content and had complete information on sputum microbiology and inflammatory mediators at the baseline evaluation were identified [26] and selected for the analysis when they presented bronchial colonization by *H. influenzae* or negative sputum cultures. Bronchial colonization by other PPMs showed high heterogeneity and low prevalence figures (<10%) in the PAC-COPD Study, and were excluded from the analysis. The research protocol was approved by the ethics committees of all participating hospitals and written informed consent was obtained from all subjects.

Clinical and functional variables

Patients were enrolled at their first hospital admission for COPD exacerbation and answered during this admission an epidemiologic questionnaire that covered smoking habits, respiratory symptoms and treatments the previous year, performing all clinical tests at least three months after hospital discharge and when clinically stable.

Functional characteristics assessed included results of forced spirometry and reversibility testing, which were performed before sputum induction. Detailed information about the sources of the questionnaires and standardization of the tests used in the PAC-COPD study has been published elsewhere [24,27].

Sputum induction

Spontaneous sputum was collected for microbiology and for measurements of specific immunity against *H. influenzae* and metalloproteinase activity. In patients unable to produce sputum spontaneously a sample was induced according to standard methods [28-30]. Patients were pre-treated with an inhaled β -adrenergic agent 10 minutes before nebulization of increasing concentrations of saline (0.9%, 3%, 4% and 5%), for seven minutes each in order to induce sputum. Patients were asked to blow their nose, rinse their mouth, and swallow water before the procedure, and the nebulization was interrupted when the sputum volume collected was 1 ml or more [31]. After each induction the patient attempted to cough up sputum into a sterile plastic dish. The first sputum sample was taken for the microbiologic exam and later sputum samples were used to analyze inflammatory markers, specific immunity and metalloproteinases. Recovered sputum was processed within 60 minutes of collection to guarantee cell viability [32], that was determined by trypan blue exclusion in a Neubauer hemocytometer [24,25], and kept at 4°C when stored. Under the assumption that samples with 20% squamous cells or fewer were representative of tracheobronchial secretions [33], stable patients who expectorated samples with squamous cell contents below that limit were selected for the present analysis.

Microbiology and inflammatory markers in sputum

Sputum samples were weighed, processed with an equal volume of dithiothreitol (DTT) (Sputasol, Oxoid Ltd., Hants, UK), and cultured according to standard methods. Microbiological processing included determination of microbial typology and load through serial dilutions and culture in selective media for PPMs, according to standard methods [34] with quantitative cultures expressed as colony-forming units (cfu) per milliliter. Cultures were considered positive for bronchial colonization by *H. influenzae* when loads were 100 cfu/ml or higher.

Sputum was separated from contaminating saliva by macroscopic examination. Selected sputum was mixed with four times its weight of DTT solution and vortexed. A weight of phosphate-buffered saline solution equal to that of DTT was then added, and the whole mixture was further vortexed. The suspension was filtered through a 48- μ m nylon gauze. Total inflammatory cell count, expressed as the absolute number of cells per gram of sputum, was calculated by subtracting squamous cells

from the total cell count. Absolute and differential cell counts for neutrophils were calculated by counting 400 non-squamous cells on Wright-stained slides. The remaining suspension was centrifuged at 750g and the supernatant was decanted and stored at -80°C.

Cytokine concentrations (interleukin [IL] -1 β , IL-6, IL-8) were measured in the supernatant using a cytokine bead array (BD Biosciences, San Diego CA, USA). The detection limits of these assays were 7.2 pg/ml for IL-1 β , 2.5 pg/ml for IL-6 and 3.6 pg/ml for IL-8. All assays were performed in duplicate and reported values correspond to the average of the two determinations.

Specific IgA against *Haemophilus influenzae* in sputum

ELISA was used to determine the IgA antibody level against *H. influenzae* in the supernatant of the recovered sputum samples. The capture antigen was prepared as follows: ten distinct isolates of *H. influenzae*, distinguished by different pulsed-field gel electrophoresis patterns (Figure 1), were grown overnight on chocolate agar plates at 37°C and 5% CO₂. Several colonies were inoculated to brain heart infusion broth supplemented with 10 μ g/ml of hemin and β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) and incubated at 37°C. Bacterial concentration was adjusted to optical density (OD) \approx 0.1 at a wavelength of 625 nm (\approx 10⁸ cfu/ml) and the ten isolates were mixed to create a pooled sample of *H. influenzae* strains. Fifty μ l of this suspension were used to coat each well on a microtiter plate (Nunc Brand, Denmark) and the plate was incubated overnight at 37°C. Between each step the wells were washed three times with PBS (400 μ l/well) and in all following steps the reagents used were added to the wells in volumes of 100 μ l. The wells were blocked by addition of 200 μ l of PBS-1% bovine serum albumin (BSA) and incubated at 37°C for two hours. The wells were then washed, and sputum supernatants diluted in PBS were added and incubated for 1 h at 37°C. After washing, goat-anti human IgA (Sigma) diluted 1:1000 in PBS-1%BSA was

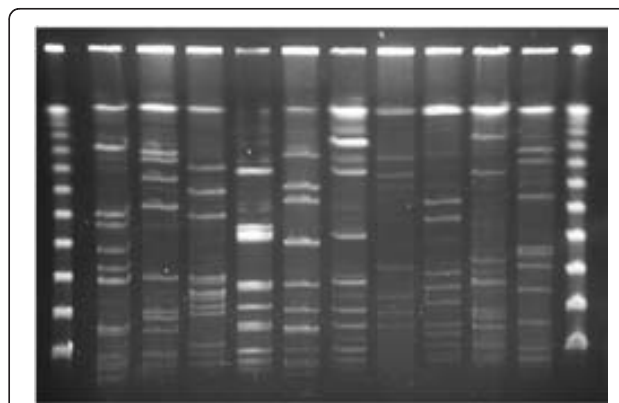


Figure 1 Ten distinct isolates of *H. Influenzae*, isolated from COPD patients, used as capture antigen in ELISA testing.

added and incubated 1 h at 37°C. Following another washing, anti-goat conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) diluted 1:5000 in PBS-1%BSA was added and incubated 1 h at 37°C. Color was developed after washing by adding a developing buffer containing p-Nitrophenyl phosphate (Sigma), and optical density (OD) read at 405 nm. All samples were run in triplicate and the final result was the average of the three scores. To control for day-to-day variability, an isolate of *H. influenzae* and its homologous supernatant was tested again in each plate and used as an internal control, accepting variabilities below 15% [35].

Specific IgA determinations required the availability of a volume equal or over 25 microliter of supernatant, and were performed in samples from the studied patients and in a sputum supernatant pool of nine healthy controls from general population who were used as the normal reference. Results were expressed as the OD ratio between patients and the healthy control reference (OD patients-OD pool of healthy controls/OD pool of healthy controls).

Metalloproteinase activity in sputum

Concentrations of MMP-9, both of its proenzyme of 92 kDa (proMMP-9) and its active form of 68 kDa, and of their inhibitor TIMP-1, were determined in the sputum supernatant using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), and carried out according to the manufacture's recommendations. These determinations required a volume equal or over 100 microliter of supernatant, and had detection limits of 0.5 ng/ml for MMP-9 and 3.13 ng/ml for TIMP-1.

ProMMP-9 to TIMP-1 molar ratios below 1:1 keep MMP-9 below its activity level and are the reference in healthy subjects [36]. Ratios above 1:1 are considered abnormal and are associated with availability of the active form of MMP-9 in bronchial secretions [37].

Statistical analysis

Data were analyzed using the SPSS statistical software package version 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results for categorical variables are expressed as absolute and relative frequencies, and results for continuous variables as means and standard deviations (SD), or as medians and percentiles 25-75 (P25-P75) when the distribution was not normal.

First, clinical and functional variables and bronchial inflammation markers of patients showing colonization by *H. influenzae* and non-colonized patients were compared, and the difference in the specific IgA response against *H. influenzae* in sputum found in patients colonized and non-colonized by this PPM was assessed. The ratio between the level of specific IgA against *H. influenzae* in patients and the level in healthy subjects (OD patients-OD pool of healthy controls/OD pool of healthy controls) was calculated in both groups and used for the comparison. Finally,

the concentrations of proMMP-9, TIMP-1 and active MMP-9 in patients colonized by *H. influenzae* were compared with the levels found in non-colonized patients. The molar ratio between MMP-9 and TIMP-1 was additionally calculated and also used for the comparisons between patients colonized by these PPMs and non-colonized patients. All analyses were performed using chi-square, Fisher exact or Mann-Whitney U tests as required. Statistical tests were two-sided, and a p value of 0.05 or less was reported as statistically significant.

Results

Sputum quality

One hundred thirty-three participants in the PAC-COPD Study produced good quality sputum samples which showed a low proportion of squamous cells (2 [0.5-6]) and high cell viability (79 [64-90]), which were considered as representative of bronchial secretions. They were COPD patients with an average age of 70 (9) years and moderate lung function impairment (mean post-bronchodilator forced expiratory volume in one second [FEV₁] 52% [SD 16] of predicted) (Table 1). In 39 of these patients, PPMs were recovered from sputum (29.3%), and in 22 (17%) of them *H. influenzae* was the bacterium recovered.

Patients with bronchial colonization by *H. influenzae* or negative sputum cultures were the target population for the analysis of specific IgA (n=116), and sputum supernatant for the measurement of specific IgA against *H. influenzae* was available from 54 of these patients (46.5%), 21 colonized by the PPM and 33 non-colonized, who were the population subsample analyzed. In 44 patients sputum availability allowed also the determination of MMP-9 and TIMP-1 (38%), which were measured in 12 patients colonized by *H. influenzae* and in 32 non-colonized patients (Figure 2). The comparisons of smoking habits (pack-year), respiratory symptoms (exacerbations in the year previous to admission), and forced spirometry (postbronchodilator FEV₁%) in patients with specific IgA measured, in patients who had metalloproteinase activity determined, and in patients without sputum availability for the present analyses (n=62) did not show statistically significant differences (data not shown).

Clinical characteristics and bronchial inflammation according to colonization

Clinical differences between patients colonized by *H. influenzae* and non-colonized patients were not significant, except for higher cumulative smoking in colonized patients (103 [60-138] vs. 58 [36-90] pack-years; p= 0.002) (Table 2). A similar well-defined neutrophilic inflammatory pattern in sputum was observed in both colonized and non-colonized patients, with significantly higher median values for IL-1 β (746 [121-1802] vs. 154 [41-485] pg/ml; p=0.001) and IL-8 (16 [11-22] vs. 8

Table 1 Clinical, functional and inflammatory characteristics of bronchial secretions in patients with representative sputum samples* (n=133)

Patient characteristics	
Age (years), mean (SD)	70 (9)
Males, n (%)	124 (93)
Smoking pack-years, median (P25-P75)	67 (43-102)
Current smoker, n (%)	35 (27)
Exacerbation last year ≥ 1 , n (%)	45 (34)
FEV ₁ post-BD % pred, mean (SD)	52 (16)
Sputum characteristics	
Neutrophils/ml $\times 10^6$, median (P25-P75)	6.4 (1.7-17.1)
Neutrophils %, median (P25-P75)	72 (48-84)
IL-1 β (pg/ml), median (P25-P75)	209 (52-695)
IL-6 (pg/ml), median (P25-P75)	124 (54-259)
IL-8 ($\times 10^3$) (pg/ml), median (P25-P75)	11 (4-16)
Colonized by PPMs, n (%)	39 (29.3)
Colonized by <i>H. influenzae</i> , n (%)	22 (17)
Bacterial load of <i>H. influenzae</i> $\times 10^6$ (cfu/ml), median (P25-P75) ^{†*}	5.4 (1-12)

*Patients with representative sputum samples according to percentage of squamous cells $\leq 20\%$.

^{†*} In patients with a positive culture for *H. influenzae*. Expressed as $\times 10^6$ cfu/ml.

Definition of abbreviations: SD = standard deviation; P25-P75 = percentile 25-percentile 75; BD = bronchodilator; FEV₁= forced expiratory volume in 1 second; IL = interleukin; PPMs = potential pathogenic microorganisms; cfu = colony forming units.

[3-15] ($\times 10^3$) pg/ml; $p < 0.001$) in patients colonized by *H. influenzae*.

Specific IgA against *H. influenzae* in bronchial secretions

Level of IgA antibody against whole-cell *H. influenzae* antigens in the sputum of colonized and non-colonized patients was related to the level of IgA against this PPM

in the sputum samples of nine healthy controls. IgA levels were significantly lower in patients colonized by *H. influenzae* (15 [4-37]) than in non-colonized patients (31 [10-75]) ($p=0.033$, Mann-Whitney U test) (Figure 3).

Sputum metalloproteinase activity

The concentration of proenzyme MMP-9 was significantly higher in patients colonized by *H. influenzae* (1903 [1488-6699] ng/ml) than in non-colonized patients (639 [373-972] ng/ml) ($p < 0.001$, Mann-Whitney U test) (Figure 4). No differences were found in the levels of TIMP-1 between these groups (Figure 5). When the level of the active form of MMP-9 was assessed, it was also higher in patients colonized by *H. influenzae* (126 [25-277] ng/ml) than in non-colonized patients (39 [14-68] ng/ml), a comparison that reached statistical significance ($p=0.021$, Mann-Whitney U test) (Figure 6).

The calculation of the molar ratio between proMMP-9 and TIMP-1 showed that bronchial colonization by *H. influenzae* was associated with pro MMP-9/TIMP-1 ratios above 1:1 (2.1 [0.1-12.5]), which were significantly higher than the ratios found in non-colonized patients (0.2 [0.08-0.5]) ($p=0.030$, Mann-Whitney U test) (Figure 7).

Discussion

Sputum samples of a well-characterized cohort of stable COPD patients who has not required repeated admissions for exacerbation of their disease has been analyzed in the

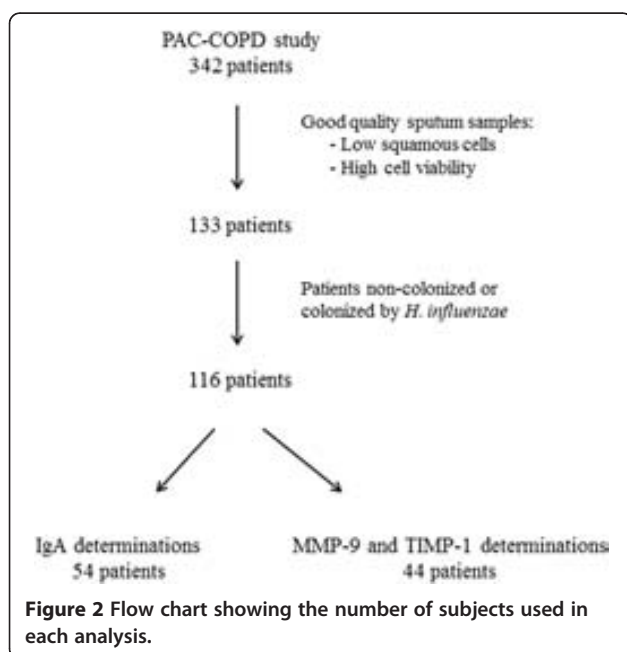


Table 2 Patient characteristics and inflammatory mediators in sputum according to bronchial colonization by *Haemophilus influenzae* (n=116)

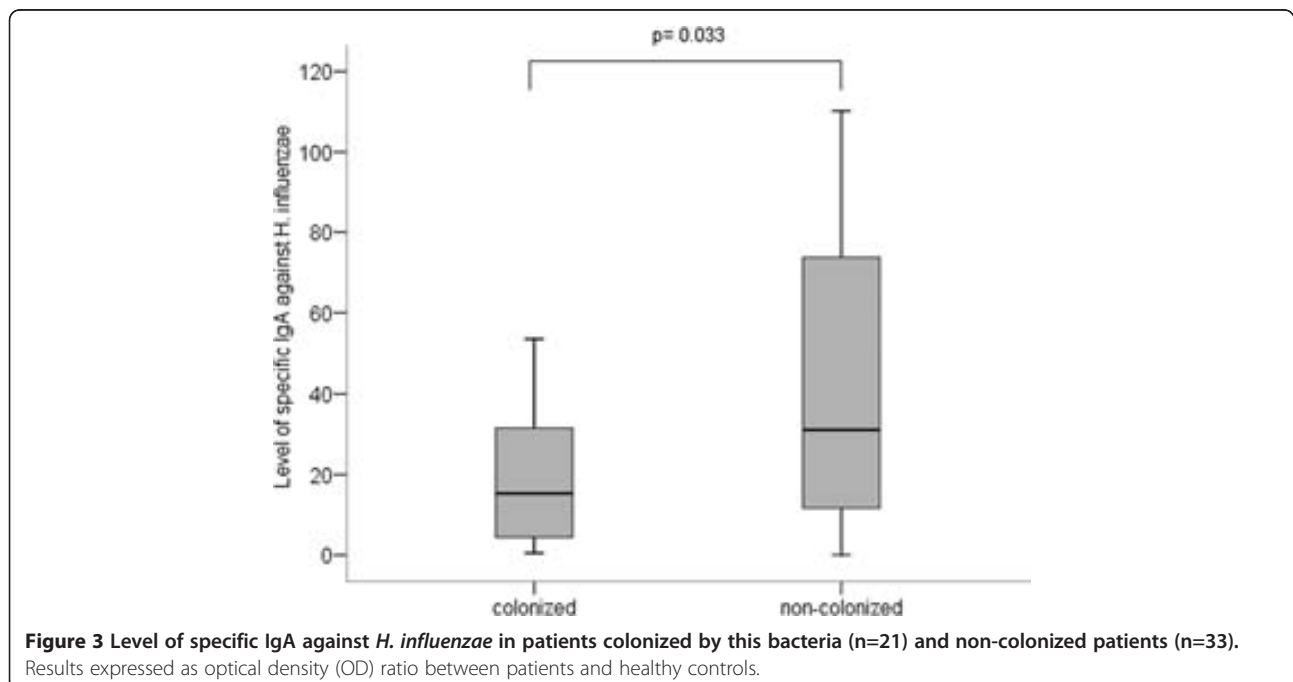
	Non-colonized n=94	Colonized by <i>H. influenzae</i> n=22	p value*
Patient characteristics			
Age (years), mean (SD)	69 (9)	70 (8)	0.880
Current smoker, n (%)	24 (26)	6 (27)	0.932
Smoking pack-years, median (P25-P75)	58 (36-90)	103 (60-138)	0.002
FEV ₁ post-BD % pred, mean (SD)	52 (16)	50 (15)	0.597
Inhaled corticosteroids, n (%)	11 (12)	2 (9)	0.727
Inflammatory mediators in sputum			
Total cells/ml × 10 ⁶ , median (P25-P75)	12 (4-24)	7 (4-22)	0.388
Neutrophils/ml × 10 ⁶ , median (P25-P75)	7 (2-18)	4 (1-14)	0.526
IL-1β (pg/ml), median (P25-P75)	154 (41-485)	746 (121-1802)	<0.001
IL-6 (pg/ml), median (P25-P75)	109 (50-201)	168 (53-436)	0.172
IL-8 (×10 ³) (pg/ml), median (P25-P75)	8 (3-15)	16 (11-22)	< 0.001

*Analyses performed using chi-square, Fisher exact or Mann-Whitney U tests as required.

present study. Relationships between bronchial colonization by *H. influenzae*, the specific IgA response against this PPM, and metalloproteinase activity in bronchial secretions were examined. Bronchial colonization by *H. influenzae* was associated with low levels of IgA against this PPM in sputum, a defective specific immunologic response that may difficult the eradication of *H. influenzae* from the bronchial tree. Levels of proMMP-9 and its active form, additionally, were high in patients colonized by *H. influenzae*, supporting a significant impact of this PPM on the metalloproteinase activity in bronchial secretions, in the

absence of exacerbation symptoms. These findings suggest that bronchial colonization by *H. influenzae* may be related to a defective immune response against this PPM, and associated with an increase in MMP-9 levels to concentrations that may cause extracellular matrix destruction and airway remodeling.

The low levels of specific IgA against *H. influenzae* found in the present study in colonized patients may be related to protease production by the PPM or due to a defective response of the bronchial mucosa. The immune response of the bronchial tree is the first defense line for the protection



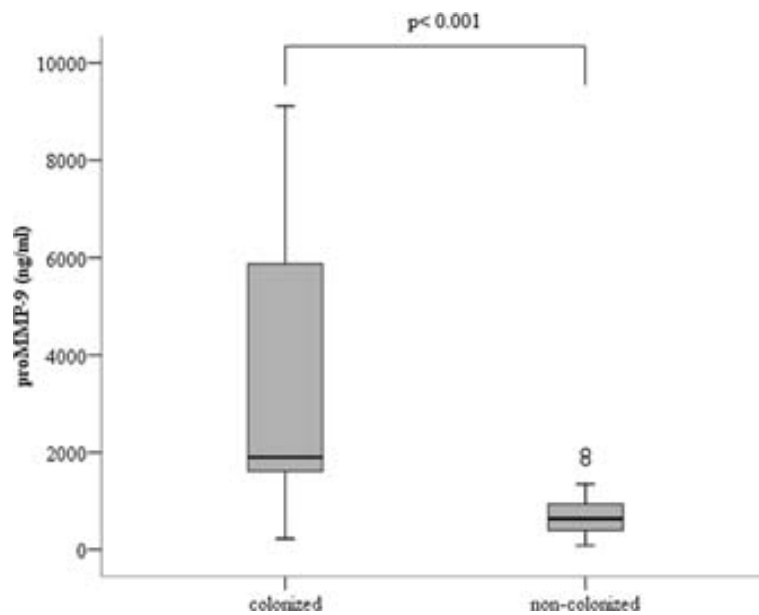


Figure 4 Proenzyme MMP-9 concentration in the sputum supernatant of patients colonized by *H. influenzae* (n=12) and non-colonized patients (n=32).

of the respiratory system, with a major role of local immunoglobulins, functionally related to the epithelial barrier and mucociliary clearance [38]. Secretory IgA originates from the selective transport of polymeric IgA across the epithelial cells, and is the predominant type of antibody in the bronchial mucosa. This immunoglobulin agglutinates colonizing bacteria and participates in the inhibition of bacterial mucosal adherence [34]. Strains of *H. influenzae*

produce IgA proteases [39,40], and levels of sIgA in bronchial secretions are partly influenced by the production of specific enzymes that cleave the subtype 1 of this immunoglobulin (IgA1), separating the antigen recognition fragments from the constant region of IgA, in patients colonized by this PPM [10,14,15,41-43]. Because the first line of the specific immunologic defense against *H. influenzae* is provided by sIgA [9], determinants of the level of

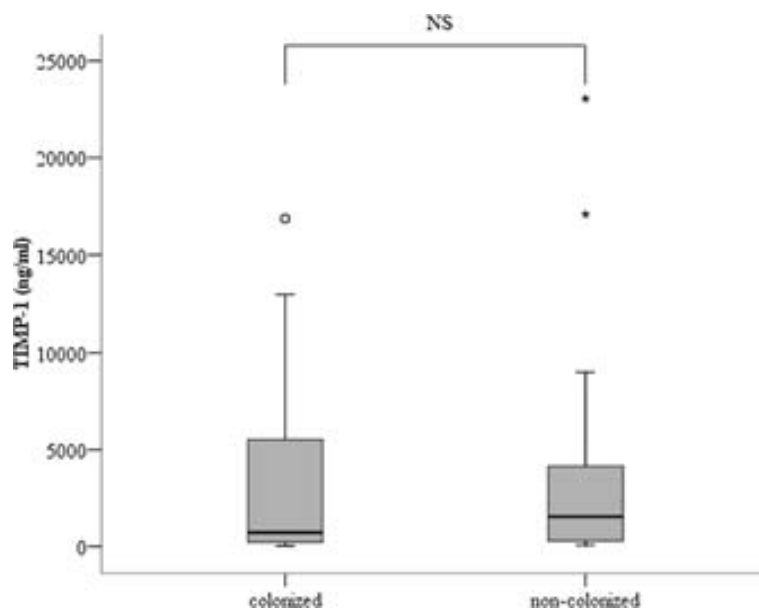


Figure 5 TIMP-1 concentration in the sputum supernatant of patients colonized by *H. influenzae* (n=12) and non-colonized patients (n=32).

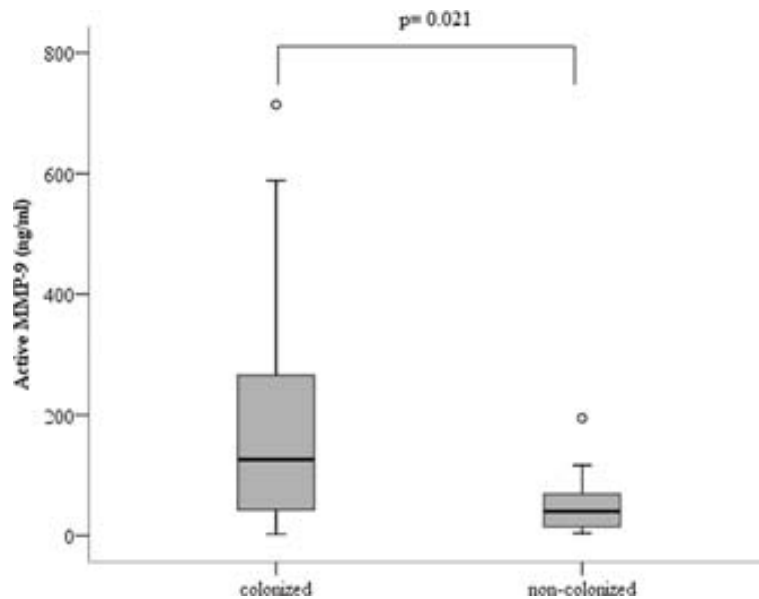


Figure 6 Active MMP-9 concentration in the sputum supernatant of patients colonized by *H. influenzae* (n=12) and non-colonized patients (n=32).

this immunoglobulin in bronchial secretions, related to protease production, local consumption or defective production may play a role in the pathogenesis of bronchial colonization and infection in COPD [44], an hypothesis supported by the results of the present study.

We have found high levels of the remodeling protein proMMP-9 and its active form in stable COPD patients colonized by *H. influenzae*. Previous studies have reported a relationship between bronchial colonization and

inflammation in these patients, identifiable through high levels of IL-1 β and IL-8 in bronchial secretions [45-47], with a higher effect when *H. influenzae* is the colonizer [26]. Interleukin 1 β , among other mediators, stimulate the release of MMP from alveolar macrophages, and upregulate MMP activity in the COPD airway [18]. Destruction of small bronchi and alveoli, leading to emphysema, involves members of the MMP family [36], and there is significant evidence that these proteases play a significant role in

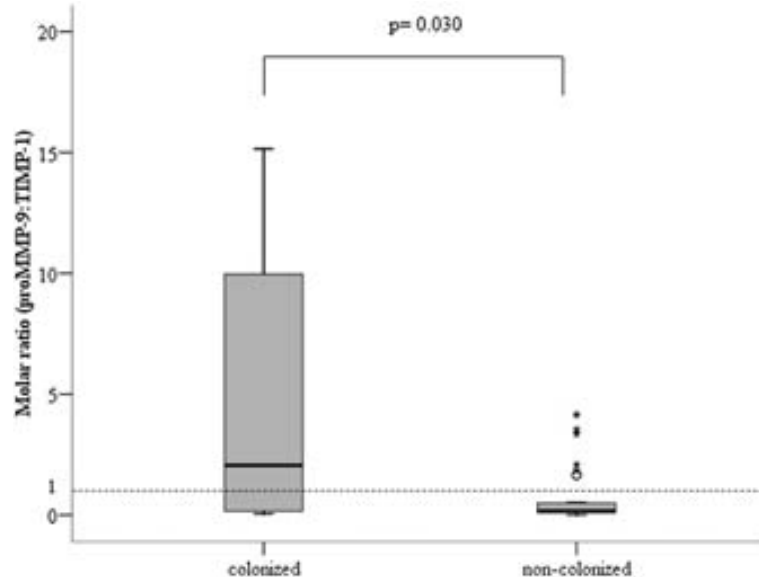


Figure 7 Molar ratio between proenzyme MMP-9 and TIMP-1 in colonized patients colonized by *H. influenzae* (n=12) and non-colonized patients (n=32).

COPD pathogenesis. Transgenic mice over-expressing MMP-1 develop emphysema [48], whilst MMP-12 knock-out mice are protected from emphysema despite prolonged cigarette smoke exposure [45]. High levels of MMP-8, -9 and TIMP-1 have been found in COPD [17,49], and MMP-9 level in bronchial secretions was higher in smokers with COPD than in smokers without functional limitation [50,51]. A marked increase in MMP-9 expression and activity in lung parenchyma and increased MMP-9/TIMP-1 ratios in induced sputum have been also reported in patients with COPD, when compared with healthy subjects [19]. Interaction with TIMPs is the physiological way to control the proteolytic activity of MMPs in normal conditions, and an imbalance between MMPs and TIMPs has been proposed as the cause of the increased levels of MMP-9 that are often detected in COPD patients [23,37,49,52,53]. TIMP-1 is the major endogenous inhibitor of MMP-8 and MMP-9, and the levels of this protein are usually elevated in COPD [23]. As far as we know, the present study is the first to examine the relationship between colonization by *H. influenzae*, MMP-9 and TIMP-1 in bronchial secretions of stable COPD patients. We have found high levels of both proMMP-9 and its active form in patients colonized by *H. influenzae*, suggesting that the presence of *H. influenzae* in the airways of stable COPD patients may have an effect on tissue matrix. The molar ratio between proMMP-9 and TIMP-1 was also found higher in patients colonized by *H. influenzae* in the present study. ProMMP-9 to TIMP-1 ratios below 1:1 keep the metalloproteinase below its activity level and are the reference in healthy subjects [36]. Accordingly, values above 1:1 must be considered abnormal and associated with availability of the active form of MMP-9 in bronchial secretions, at levels that may be high enough to be associated with disease [37].

Limitations of the performed study should be considered. Firstly, the present study is cross-sectional, and the correlation between low levels of IgA and persistent or recurrent colonization by *H. influenzae* cannot be concluded from the available data. Secondly, the PAC-COPD cohort included COPD patients who had mainly moderate disease and has been hospitalized because an exacerbation only once, and this characteristic determines that the obtained results may not be applicable to patients with advanced COPD, who also show a higher prevalence of bronchial colonization due to other PPMs, which are unusual in patients with moderate disease. The proportion of females in the PAC-COPD Study is low, a common finding in epidemiologic studies performed in Spain, attributable to the delayed introduction of smoking habits in women in the region, and determines that the observed results may not be extrapolated to female COPD patients. Finally, we have only analyzed the IgA response against *H. Influenzae*, because other

COPD colonizers had low figures in the PAC-COPD Study. Therefore, further studies will be necessary to analyze the specific immunity against other PPMs in COPD patients.

Conclusions

In conclusion, our clinically stable COPD patients colonized by *H. influenzae* had lower levels of specific IgA against this microorganism and higher values of the active form of MMP-9 in the sputum supernatant than non-colonized patients. *H. influenzae* colonization may be facilitated by this defective specific immune response, and the colonization by this PPM may cause structural changes in the extracellular matrix through the stimulation of metalloproteinase activity.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LM carried out the experimental assays, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. AM contributed to the patient selection and management, interpretation of data and database handling. JGA participated in the conception and design of PAC-COPD study and was involved in database handling, statistical analysis and quality control. JS and JB were involved in conception and design of the methodology of the study. EM designed and coordinated the study and helped to draft the manuscript. All authors revised the manuscript critically for important intellectual content, and read and approved the final manuscript.

Authors' information

The Phenotype and Course of COPD (PAC-COPD) Study Group: Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona: Josep M Antó (Principal Investigator), Judith Garcia-Aymerich (project coordinator), Marta Benet, Jordi de Batlle, Ignasi Serra, David Donaire-Gonzalez, Stefano Guerra; Hospital del Mar-IMIM, Barcelona: Joaquim Gea (center coordinator), Eva Balcells, Angel Gayete, Mauricio Orozco-Levi, Ivan Vollmer; Hospital Clínic-Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona: Joan Albert Barberà (center coordinator), Federico P Gómez, Carles Paré, Josep Roca, Robert Rodríguez-Roisin, Xavier Freixa, Diego A Rodríguez, Elena Gimeno, Karina Portillo; Hospital General Universitari Vall D'Hebron, Barcelona: Jaume Ferrer (center coordinator), Jordi Andreu, Esther Pallisa, Esther Rodríguez; Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona: Pere Casan (center coordinator), Rosa Güell, Ana Giménez; Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona: Eduard Monsó (center coordinator), Alicia Marín, Sara Barea, Josep Morera; Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat: Eva Farrero (center coordinator), Joan Escarriball; Hospital de Sabadell, Corporació Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí (Universitat Autònoma de Barcelona), Sabadell: Antoni Ferrer (center coordinator); Hospital Universitari Son Dureta, Palma de Mallorca: Jaume Sauleda (center coordinator), Àlvar G Agustí, Bernat Togores; Hospital de Cruces, Barakaldo: Juan Bautista Gáldiz (center coordinator), Lorena López; Hospital General Universitari, València: José Belda

Acknowledgements

We thank Michael Maudsley for providing an outline for this manuscript and support in editing and journal styling. This study was funded by Fondo de Investigación Sanitaria (PI060684/PI0901612), Fundació Parc Taulí, Societat Catalana de Pneumologia and CIBER de Enfermedades Respiratorias – CIBERES. CIBER de Enfermedades Respiratorias, CIBERES is an initiative of Instituto de Salud Carlos III.

Author details

¹Fundació Parc Taulí, Sabadell/Badalona, Spain. ²CIBER de Enfermedades Respiratorias, CIBERES, Bunyola, Spain. ³Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Barcelona, Spain. ⁴Department of Respiratory Medicine, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. ⁵Centre for Research in

Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain. ⁶Municipal Institute of Medical Research (IMIM-Hospital del Mar), Barcelona, Spain. ⁷Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain. ⁸CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain. ⁹Department of Respiratory Medicine, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, Spain. ¹⁰Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain. ¹¹Department of Respiratory Medicine, Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell, Spain.

Received: 20 September 2012 Accepted: 5 December 2012

Published: 11 December 2012

References

- Sethi S, Murphy TF: Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008, **359**(22):2355–2365.
- Berenson CS, Murphy TF, Wrona CT, Sethi S: Outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potent and selective inducer of human macrophage proinflammatory cytokines. *Infect Immun* 2005, **73**(5):2728–2735.
- Doring G, Parameswaran IG, Murphy TF: Differential adaptation of microbial pathogens to airways of patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Microbiol Rev* 2011, **35**(1):124–146.
- Srikhanta YN, Fox KL, Jennings MP: The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes. *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**(3):196–206.
- Starmer TD, Zhang N, Kim G, Apicella MA, McCray PB Jr: *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **174**(2):213–220.
- Gilsdorf JR, Marrs CF, Foxman B: *Haemophilus influenzae*: genetic variability and natural selection to identify virulence factors. *Infect Immun* 2004, **72**(5):2457–2461.
- Schweda EK, Richards JC, Hood DW, Moxon ER: Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: implication in virulence. *Int J Med Microbiol* 2007, **297**(5):297–306.
- King PT, Hutchinson PE, Johnson PD, Holmes PW, Freezer NJ, Holdsworth SR: Adaptive immunity to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**(4):587–592.
- Russell MW, Lamm ME, et al: Biological Activities of IgA. In *Mucosal Immunology*. Edited by Ogra JM, Lamm ME, Warren S, John B, McGhee JR; 1999:225–240.
- Kett K, Brandtzaeg P, Radl J, Haajman JJ: Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues. *J Immunol* 1986, **136**(10):3631–3635.
- Pilette C, Durham SR, Vaerman JP, Sibille Y: Mucosal immunity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: a role for immunoglobulin A? *Proc Am Thorac Soc* 2004, **1**(2):125–135.
- Kraehenbuhl JP, Neutra MR: Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 1992, **72**(4):853–879.
- Kilian M, Mestecky J, Schrohenloher RE: Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect Immun* 1979, **26**(1):143–149.
- Mansa B, Kilian M: Retained antigen-binding activity of Fab alpha fragments of human monoclonal immunoglobulin A1 (IgA1) cleaved by IgA1 protease. *Infect Immun* 1986, **52**(1):171–174.
- Mulks MH, Shoberg RJ: Bacterial immunoglobulin A1 proteases. *Methods Enzymol* 1994, **235**:543–554.
- Marin A, Monso E, Garcia-Nunez M, Sauleda J, Noguera A, Pons J, Agusti A, Morera J: Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur Respir J* 2010, **35**(2):295–302.
- Vernooy JH, Lindeman JH, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EF: Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest* 2004, **126**(6):1802–1810.
- Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ: Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, **26**(5):602–609.
- Asano K, Shikama Y, Shoji N, Hirano K, Suzuki H, Nakajima H: Tiotropium bromide inhibits TGF-beta-induced MMP production from lung fibroblasts by interfering with Smad and MAPK pathways in vitro. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2010, **5**:277–286.
- Boschetto P, Quintavalle S, Zeni E, Leprotti S, Potena A, Ballerin L, Papi A, Palladini G, Luisetti M, Annovazzi L, et al: Association between markers of emphysema and more severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2006, **61**(12):1037–1042.
- Elkington PT, Friedland JS: Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax* 2006, **61**(3):259–266.
- Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Konttinen YT: Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 1998, **78**(9):1077–1087.
- Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE: Sputum matrix metalloproteinases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Med* 2005, **99**(6):703–710.
- Balcells E, Anto JM, Gea J, Gomez FP, Rodriguez E, Marin A, Ferrer A, de Batlle J, Farrero E, Benet M, et al: Characteristics of patients admitted for the first time for COPD exacerbation. *Respir Med* 2009, **103**(9):1293–1302.
- Garcia-Aymerich J, Gomez FP, Benet M, Farrero E, Basagana X, Gayete A, Pare C, Freixa X, Ferrer J, Ferrer A, et al: Identification and prospective validation of clinically relevant chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subtypes. *Thorax* 2010, **66**(5):430–437.
- Marin A, Garcia-Aymerich J, Sauleda J, Belda J, Millares L, Garcia-Nunez M, Serra I, Benet M, Agusti A, Anto JM, et al: Effect of Bronchial Colonisation on Airway and Systemic Inflammation in Stable COPD. *COPD* 2012, **9**(2):121–130.
- Garcia-Aymerich J, Gomez FP, Anto JM: [Phenotypic characterization and course of chronic obstructive pulmonary disease in the PAC-COPD Study: design and methods]. *Arch Bronconeumol* 2009, **45**(1):4–11.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J: Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992, **47**(1):25–29.
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE: Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **154**(2 Pt 1):308–317.
- Sutherland ER, Pak J, Langmack EL, Silkoff PE, Martin RJ: Safety of sputum induction in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2002, **96**(7):482–486.
- Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, Dales RE: Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**(2):349–355.
- Efthimiadis A, Jayaram L, Weston S, Carruthers S, Hargreave FE: Induced sputum: time from expectoration to processing. *Eur Respir J* 2002, **19**(4):706–708.
- Fujimoto K, Kubo K, Yamamoto H, Yamaguchi S, Matsuzawa Y: Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 1999, **115**(3):697–702.
- Balows A: *Manual of Clinical Microbiology*, 5th edn: Washington DC. Microbiology: American Society of; 1991.
- Bakri F, Brauer AL, Sethi S, Murphy TF: Systemic and mucosal antibody response to *Moraxella catarrhalis* after exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 2002, **185**(5):632–640.
- Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD: Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006, **533**(1–3):133–144.
- Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R: Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med* 2003, **97**(6):634–639.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, et al: The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004, **350**(26):2645–2653.
- Kilian M, Mestecky J, Russell MW: Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* 1988, **52**(2):296–303.
- Plaut AG: The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1983, **37**:603–622.

41. Fernaays MM, Lesse AJ, Cai X, Murphy TF: **Characterization of igaB, a second immunoglobulin A1 protease gene in nontypeable Haemophilus influenzae.** *Infect Immun* 2006, **74**(10):5860–5870.
42. Fernaays MM, Lesse AJ, Sethi S, Cai X, Murphy TF: **Differential genome contents of nontypeable Haemophilus influenzae strains from adults with chronic obstructive pulmonary disease.** *Infect Immun* 2006, **74**(6):3366–3374.
43. Murphy TF, Lesse AJ, Kirkham C, Zhong H, Sethi S, Munson RS Jr: **A clonal group of nontypeable Haemophilus influenzae with two IgA proteases is adapted to infection in chronic obstructive pulmonary disease.** *PLoS One* 2011, **6**(10):25923.
44. Polosukhin W, Cates JM, Lawson WE, Zaynagetdinov R, Milstone AP, Massion PP, Ocak S, Ware LB, Lee JW, Bowler RP, *et al*: **Bronchial secretory immunoglobulin a deficiency correlates with airway inflammation and progression of chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2011, **184**(3):317–327.
45. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ: **Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **153**(2):530–534.
46. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS: **Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**(9):991–998.
47. Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A: **Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J* 1999, **14**(5):1015–1022.
48. Pesci A, Balbi B, Majori M, Cacciani G, Bertacco S, Alciato P, Donner CF: **Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J* 1998, **12**(2):380–386.
49. Ilumets H, Ryttilä P, Demedts I, Brusselle GG, Sovijarvi A, Myllärniemi M, Sorsa T, Kinnula VL: **Matrix metalloproteinases -8, -9 and -12 in smokers and patients with stage 0 COPD.** *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007, **2**(3):369–379.
50. Louhelainen N, Stark H, Mazur W, Ryttilä P, Djukanovic R, Kinnula VL: **Elevation of sputum matrix metalloproteinase-9 persists up to 6 months after smoking cessation: a research study.** *BMC Pulm Med* 2010, **10**:13.
51. Lowrey GE, Henderson N, Blakey JD, Corne JM, Johnson SR: **MMP-9 protein level does not reflect overall MMP activity in the airways of patients with COPD.** *Respir Med* 2008, **102**(6):845–851.
52. Baines KJ, Simpson JL, Gibson PG: **Innate immune responses are increased in chronic obstructive pulmonary disease.** *PLoS One* 2011, **6**(3):18426.
53. van Diemen CC, Postma DS, Siedlinski M, Blokstra A, Smit HA, Boezen HM: **Genetic variation in TIMP1 but not MMPs predict excess FEV1 decline in two general population-based cohorts.** *Respir Res* 2011, **12**:57.

doi:10.1186/1465-9921-13-113

Cite this article as: Millares *et al.*: Specific IgA and metalloproteinase activity in bronchial secretions from stable chronic obstructive pulmonary disease patients colonized by *Haemophilus influenzae*. *Respiratory Research* 2012 **13**:113.

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



Bronchial microbiome of severe COPD patients colonised by *Pseudomonas aeruginosa*

L. Millares · R. Ferrari · M. Gallego · M. Garcia-Nuñez ·
V. Pérez-Brocal · M. Espasa · X. Pomares · C. Monton ·
A. Moya · E. Monsó

Received: 18 November 2013 / Accepted: 20 December 2013
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The bronchial microbiome in severe COPD during stability and exacerbation in patients chronically colonised by *Pseudomonas aeruginosa* (PA), has not been defined. Our objective was to determine the characteristics of the bronchial microbiome of severe COPD patients colonised and not colonised by *P. aeruginosa* and its changes during exacerbation. COPD patients with severe disease and frequent exacerbations were categorised according to chronic colonisation by *P. aeruginosa*. Sputum samples were obtained in stability and exacerbation, cultured, and analysed by 16S rRNA gene amplification and pyrosequencing. Sixteen patients were included, 5 of them showing chronic colonisation by *P. aeruginosa*. *Pseudomonas* genus had significantly higher relative abundance in stable colonised patients ($p=0.019$), but no significant differences in biodiversity parameters were found

between the two groups (Shannon, 3 (2–4) vs 3 (2–3), $p=0.699$; Chao1, 124 (77–159) vs 140 (115–163), $p=0.364$). In PA-colonised patients bronchial microbiome changed to a microbiome similar to non-PA-colonised patients during exacerbations. An increase in the relative abundance over 20 % during exacerbation was found for *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Achromobacter* and *Corynebacterium* genera, which include recognised potentially pathogenic microorganisms, in 13 patients colonised and not colonised by *P. aeruginosa* with paired samples. These increases were not identified by culture in 5 out of 13 participants (38.5 %). Stable COPD patients with severe disease and PA-colonised showed a similar biodiversity to non-PA-colonised patients, with a higher relative abundance of *Pseudomonas* genus in bronchial secretions.

Andrés Moya and Eduard Monsó contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10096-013-2044-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Millares · M. Garcia-Nuñez
Fundació Parc Taulí, Sabadell, Spain

L. Millares · M. Gallego · M. Garcia-Nuñez · E. Monsó
CIBER de Enfermedades Respiratorias, CIBERES, Bunyola, Spain

L. Millares · E. Monsó
Universitat Autònoma de Barcelona, Esfera UAB, Barcelona, Spain

L. Millares · M. Garcia-Nuñez
Fundació Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

R. Ferrari · V. Pérez-Brocal · A. Moya
Genomics and Health Area, Centro Superior de Investigación en Salud Pública—Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (CSISP-FISABIO), Valencia, Spain

R. Ferrari · V. Pérez-Brocal · A. Moya
CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain

R. Ferrari · V. Pérez-Brocal · A. Moya
Department of Genetics, Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, (ICBiBE) Universitat de València, Valencia, Spain

M. Gallego · X. Pomares · C. Monton · E. Monsó (✉)
Department of Respiratory Medicine, Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell, Spain
e-mail: emonso@tauli.cat

M. Espasa
Department of Microbiology, Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell, Spain

Exacerbation in severe COPD patients showed the same microbial pattern, independently of previous colonisation by *P. aeruginosa*.

Introduction

Sputum has traditionally been used for the identification of bronchial infection by potentially pathogenic microorganisms (PPMs) in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients, and positive cultures are found in a significant proportion of patients in this clinical setting, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* being the bacteria most often recovered [1, 2]. *P. aeruginosa* is a cause of exacerbation in severe COPD patients [3–8], and studies that have collected sequential samples of bronchial secretions from patients with advanced disease have demonstrated that the acquisition of this PPM is in most cases associated with the appearance of exacerbation symptoms [9]. Advanced respiratory disease is considered a significant risk factor for *P. aeruginosa* infection when exacerbation symptoms appear, together with previous hospitalisations and antibiotics or steroid courses, and the use of antibiotic therapy targeting this PPM is recommended in current guidelines when these determinants are identified [10].

Persistence of positive cultures of bronchial secretions for *P. aeruginosa* after an exacerbation occurs in a minority of severe COPD patients, and in most cases is a transient phenomenon [11]. However, long-term persistence of *P. aeruginosa* as a chronic colonising strain has been reported in up to one fifth of COPD patients with a sputum culture positive for this PPM [9, 11, 12], and more commonly in patients who had associated bronchiectasis [13]. COPD patients with severe disease who have had previous positive cultures for *P. aeruginosa* have a worse prognosis when exacerbation symptoms appear [8], and the use of antibiotic therapy active against *P. aeruginosa* in these patients is common in current practice [12], but open to debate [14].

Currently available culture-based techniques are not suitable for the identification of up to 80 % of microorganisms inhabiting mucosal surfaces [15, 16]. Bacteria that are part of the respiratory microbiome are difficult to culture by conventional methods, and false-negative results are often found in the face of obligate anaerobes and when bacterial loads are low [17]. The application of pyrosequencing to PCR-amplified 16S rRNA gene has taken the study of microbial diversity to an unprecedented level of detail [18–20]. Culture-independent microbiological techniques have demonstrated that the bronchial tree is not sterile during health and have documented significant changes in the respiratory microbiome in chronic lung diseases [21]. In this study, we aimed to determine the differences in the bronchial microbiota in severe COPD patients with chronic colonisation by *P. aeruginosa*

and in patients non-colonised by this PPM and the change of this microbiota when an exacerbation appears, identifying the microorganisms that overgrow during the episode. Bronchial secretions were examined by amplification and pyrosequencing of the 16S rRNA gene, and patients with and without chronic colonisation by this PPM were compared, both in stability periods and during exacerbation.

Materials and methods

Design and population

We enrolled a cohort of stable severe COPD outpatients who had been diagnosed according to the criteria of the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) [22] and who had reported more than two exacerbations per year, between January and December 2010. Patients were examined at baseline in a stable condition from >8 weeks, and their sociodemographic data, smoking habits, respiratory symptoms, treatments, sputum microbiological characteristics and lung function were recorded. Participants were followed for 6 months after this baseline assessment, and follow-up visits were scheduled every 3 months, or when exacerbation symptoms appeared. Every visit included the recovery of spontaneous sputum samples that were processed for microbiological cultures and culture-independent microbiological techniques. Detailed exclusion criteria are provided in the online supplementary file. Acute episodes of increased breathlessness, sputum production and/or purulence appearing during follow-up and treatment with antibiotics and/or oral corticosteroids by a physician were considered exacerbations [23]. Patients with positive cultures for *P. aeruginosa* in three or more consecutive sputum cultures obtained during a period of 6 months before enrolment in the study were considered to be chronically colonised by this PPM [24, 25]. The present study was reviewed and approved by the local research ethics committee in Catalonia, Spain, and written informed consent was obtained from all subjects.

Clinical variables, sputum collection and microbiology

Sociodemographic data were recorded at recruitment. Patients answered an epidemiological questionnaire that covered smoking habits, respiratory symptoms, previous exacerbations and treatments. Spontaneous sputum was collected from every patient under clinical stability and during exacerbation, before the administration of antibiotic therapy. Details on the clinical variables and microbiological processing are provided in the supplementary file.

Samples and DNA extraction

Sputum samples diluted with dithiothreitol were incubated at 37 °C for 15 min and centrifuged for 10 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 1 ml of a lysis buffer containing 100 U/ml mutanolysin, 47,700 U/ml lysozyme and 2 U/ml lysostaphin, and was incubated for 30 min at 37 °C. DNA was extracted using a QIAamp DNA Blood Midi kit (Qiagen, Helden, Germany) according to the manufacturer's instructions and eluted in 200 µl of sterile water. DNA was quantified in the Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and stored at -80 °C.

PCR amplification of the V1–V3 region of the 16S rRNA gene

The hypervariable regions V1, V2 and V3 of the 16S rRNA gene were amplified with E8 forward (AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG) and B530 reverse (CCGCGGCKGCTG GCAC) primers and with 12 different barcodes. The PCRs were carried out in a volume of 40 µl with Biomix (Bioline, London, UK) and 10 mM of each primer, and were performed on the Mastercycler® pro thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). After amplification, the products were visualised in 2 % agarose gels. Amplified product was purified using NucleoFast® 96 PCR Clean-Up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), eluted in 28 µl of PCR-grade water and quantified with Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Twelve samples with different barcode sequences were pooled in equimolar amounts into a single tube and pyrosequencing

was carried out using Roche 454 GS-FLX System Titanium Chemistry.

Library analysis sequences and microbiome accession numbers

16S rRNA raw sequences were analysed using the mothur software package 1.27 [26] to remove sequences that were less than 200 bp or greater than 520 bp in length and chimeras. The Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) pipeline [27] was used for sequence processing to obtain taxonomic information. A taxonomic classification was performed and operational taxonomic units (OTUs) present in the samples at 97 % identity were determined.

Bacterial 16S rDNA data sets from this study are accessible in the European Nucleotide Archive under the study accession number PRJEB4144, available at <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB4144>, with the sample accession numbers ERS255709–739.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS statistical software package version 18 (SPSS, Chicago, IL, USA), R package (<http://www.r-project.org>), using the VEGAN library to cluster and construct abundance heat maps and LEfSe to identify differences between groups [28]. Results for categorical variables are expressed as absolute and relative frequencies and results for continuous variables as means and standard deviations (SD), or as medians and percentiles 25–75 (P25–P75) when the distribution was not normal.

Table 1 Patients' characteristics

Patients	Total	PA-colonised	Non-PA-colonised
<i>n</i>	16	5	11
Age (years), mean (SD)	71 (6)	72 (7)	70.5 (6)
Male, <i>n</i> (%)	16 (100)	5 (100)	11 (100)
Smoking (pack-years), median (IQR)	57 (57–110)	100 (50–110)	50 (40–80)
FEV ₁ post-BD (% predicted), mean (SD)	36 (30–40)	41 (30–48)	34 (30–37)
Dyspnoea scale, mean (SD)	2.25 (0.6)	2.2 (0.4)	2.3 (0.6)
BMI (kg/m ²), mean (SD)	28 (4)	28 (4)	28 (4)
6MWD (m), median (IQR)	240 (140–305)	300 (220–310)	230 (115–292)
BODE index, median (IQR)	5 (4.5–7.5)	5 (4–5)	6 (5–8)
Inhaled β ₂ -adrenergics, <i>n</i> (%)	16 (100)	5 (100)	11 (100)
Inhaled anticholinergics, <i>n</i> (%)	16 (100)	5 (100)	11 (100)
Inhaled corticosteroids, <i>n</i> (%)	16 (100)	5 (100)	11 (100)
Positive PPM culture in stability, <i>n</i> (%)	12 (86)	5 (100)	7 (64)
Chronic colonisation by <i>P. aeruginosa</i> , <i>n</i> (%)	5 (31)	5 (100)	0

No statistically significant differences between PA-colonised and non-PA-colonised patients for any variable

SD standard deviation; IQR interquartile range; FEV₁ post-BD post-bronchodilator forced expiratory volume in 1 s; BMI body mass index; 6MWD 6-min walking distance; BODE index body mass index, airflow obstruction, dyspnoea, and exercise capacity index; PPM potentially pathogenic microorganism

Table 2 Sputum cultures under stability and exacerbation

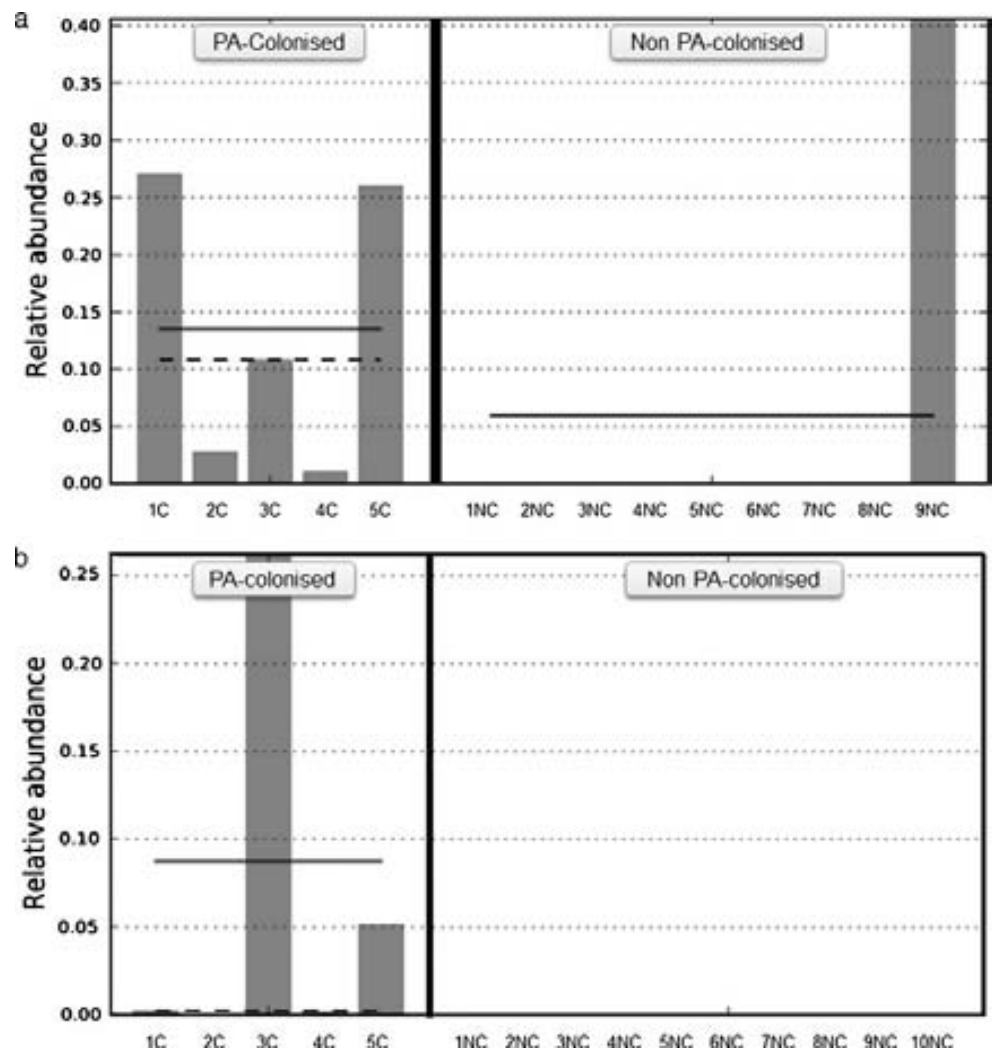
	Stable	Exacerbated
<i>n</i>	14	15
Positive culture for PPM, <i>n</i> (%)	12 (86)	10 (67)
Polymicrobial cultures, <i>n</i> (%)	4 (29)	3 (20)
Microorganisms		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 (42)	3 (30)
<i>Haemophilus influenza</i>	4 (33)	4 (40)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2 (17)	1 (10)
<i>Streptococcus pneumonia</i>	2 (17)	1 (10)
<i>Escherichia coli</i>	1 (8)	–
<i>Alcaligenes</i> spp.	1 (8)	1 (10)
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	1 (10)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	–	1 (10)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	–	1 (10)

Bacterial biodiversity was assessed through the Chao1 estimator [29] and Shannon [30] index, which estimate the

richness and homogeneity of the microbiome respectively. Both indices were calculated after subsampling with QIIME to avoid sequencing effort bias. The beta-diversity Bray–Curtis dissimilarity index [31] was used to make principal correspondence analysis.

Variability of the bacterial flora between consecutive samples of the same patient was expressed as a percentage of change of relative abundance (relative abundance consecutive sample – relative abundance baseline sample \times 100). Baseline variability for all genera was calculated by the comparison of consecutive samples obtained during stability from the same patient, to establish the expected variability range under stable conditions for severe COPD patients. Variability of the bacterial flora when exacerbation appears was equally expressed as percentage of change of relative abundance, using the previous baseline sample as the reference (relative abundance exacerbation sample – relative abundance baseline sample \times 100). Statistical tests used in the study were two-sided, and a *p* value of 0.05 or less was reported to be statistically significant.

Fig. 1 Relative abundance of *Pseudomonas* genus **a** under stability and **b** during exacerbation in PA-colonised and non-PA-colonised patients. *Solid line* represents the mean and *dashed line* the median



Results

Patients' characteristics

Sixteen severe COPD patients, 6 of them at GOLD stage III (37.5 %) and 10 at stage IV (62.5 %), were included in the study. All of them were former smokers with an average age of 71 (SD 6) years (Table 1). Five patients had criteria of chronic *P. aeruginosa* colonisation, and participants were classified into two groups according to colonisation by this PPM. Microbiological data of both groups were compared and the variability in exacerbation was assessed for PA-colonised and non-PA-colonised patients, using the previous available results in stability as the reference.

Bronchial microbiome

Microbiological cultures were performed in sputum samples obtained during stability ($n=14$) and exacerbation periods ($n=15$). Cultures were positive for PPMs in 12 stability (86 %) and 10 exacerbation samples (67 %), *P. aeruginosa* and *H. influenzae* being the most frequent isolated PPMs in the studied patients (Table 2). Culture-independent analyses were also performed in all sputum samples obtained during stability and exacerbation and the average number of sequences per sample obtained after filtering was 4,695. Most prevalent phyla in bronchial microbiome were *Proteobacteria* (50 %) and *Firmicutes* (31 %), followed by *Actinobacteria* (8 %), *Bacteroidetes* (6 %) and *Fusobacteria* (3 %). One hundred twenty-eight different OTUs were obtained at genus level (supplementary file: Figure 1), and after removing the OTUs present in only one sample, the remaining ones were used for further analysis.

The relative abundance of specific genera in samples from PA-colonised and non-PA-colonised patients were compared, during both stability and exacerbation periods, to assess the effect of this colonisation on the remaining bronchial flora. Statistically significant differences were only found in the *Pseudomonas* genus, which had a higher relative abundance in PA-colonised patients in both the stable and the exacerbated state (Fig. 1, $p=0.019$ and $p=0.003$ respectively, Mann–Whitney U test). The biodiversity of bacterial communities in sputum samples obtained during stability measured with Chao1 richness estimator and Shannon index value showed no statistically significant differences between PA-colonised and non-PA-colonised groups (Shannon index, 3 (2–4) vs 3 (2–3), $p=0.669$; Chao index, 124 (77–159) vs 140 (115–163), $p=0.364$; Mann–Whitney U test). Similar results were obtained for the samples obtained during an exacerbation (Shannon index, 4 (2–4) vs 4 (2.5–5), $p=0.595$; Chao index, 165 (93–196) vs 163 (70–193), $p=0.679$, Mann–Whitney U test).

Rarefaction curves were calculated for PA-colonised and non-PA-colonised patients using the observed species metric

(supplementary file: Figure 2) and showed that the number of sequenced taxa was enough to estimate total population diversity in both groups. Differences between microbial communities in both groups of patients were assessed by principal coordinates analyses with the Bray–Curtis beta-diversity metric, with samples obtained during stable (Fig. 2a) and exacerbation periods (Fig. 2b). Genera with the highest relative abundance were plotted in this analysis, and two clusters were observed in samples obtained during a stability period, corresponding to PA-colonised or non-PA-colonised samples, with *Pseudomonas*, *Corynebacterium* and *Moraxella* as the most abundant genera in colonised patients. During exacerbation, samples from PA-colonised and from non-PA-colonised patients did not cluster separately. The Bray–Curtis metric was also used after pooling all patients for clustering together

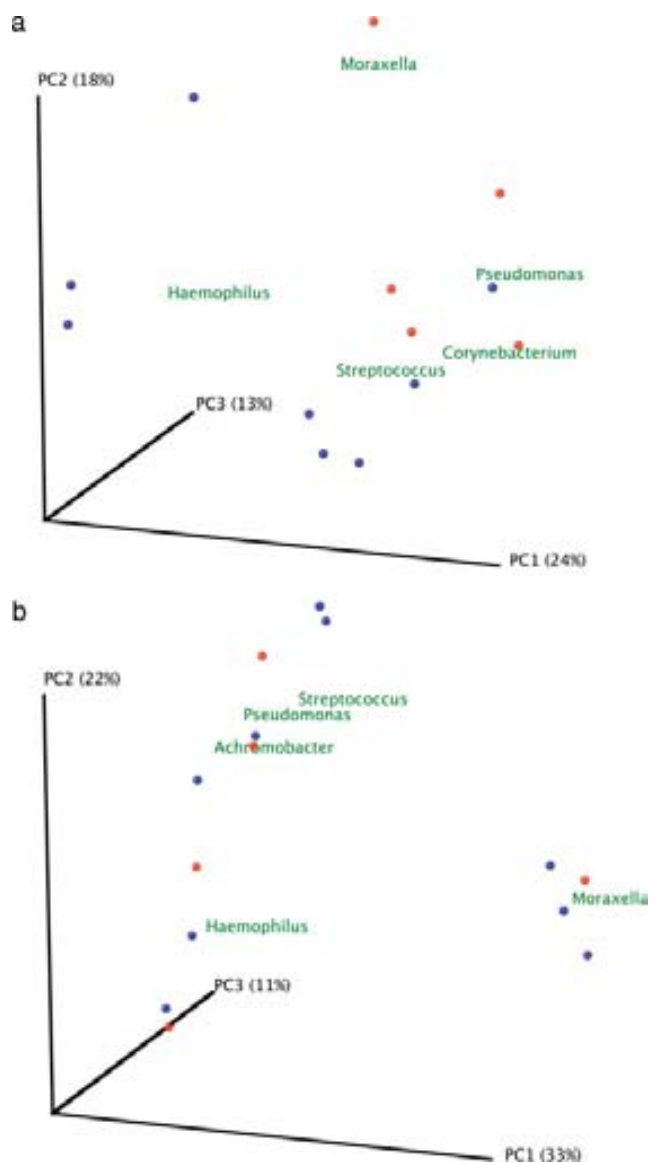


Fig. 2 Principal coordinate analysis with Bray–Curtis dissimilarity index. **a** Samples from stability and **b** samples of exacerbation. Red dots represent colonised patients, and blue dots non-PA-colonised patients

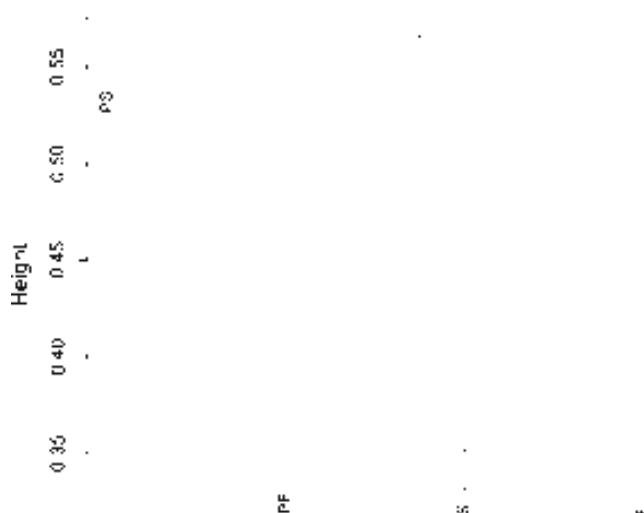
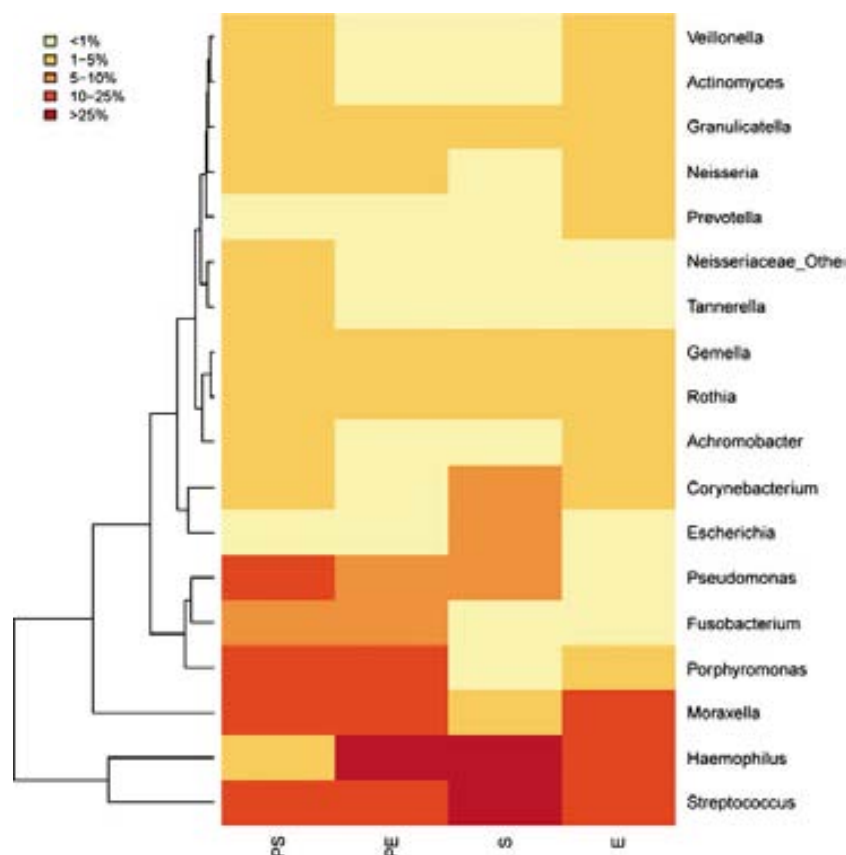


Fig. 3 Cluster dendrogram with Bray–Curtis dissimilarity index. Samples were combined depending on their clinical situation and clustered with the Bray–Curtis index, which takes values between 0 and 1 (0 meaning that samples share all the genera and 1 meaning samples do not share any). *PS* colonised by *P. aeruginosa* under stability; *PE* colonised by *P. aeruginosa* during exacerbation; *S* non-colonised by *P. aeruginosa* under stability; *E* non-colonised by *P. aeruginosa* during exacerbation)

patients colonised by *P. aeruginosa* during stability (*PS*) and exacerbation (*PE*); and stable (*S*) and exacerbated (*E*) non-*PA*-colonised COPD patients, according to genera composition

Fig. 4 Heat map showing the most abundant genera in the four groups of samples. Columns represent the groups and rows the genera whose relative abundance is >1 % in at least one sample. The relative abundance of each genus is represented by the colour key



(Fig. 3). In this analysis the bacterial community obtained during an exacerbation in *PA*-colonised patients showed a closer similarity to the microbiome of non-*PA*-colonised severe COPD participants, in both stable and exacerbated states, than to the microbiome recovered from *PA*-colonised patients during their stability periods. When most abundant genera in the four clinical situations were represented in a heat map, a range of genera showed low relative abundance but high prevalence, which included *Veillonella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Gemella*, *Rothia* and *Achromobacter*, with *Streptococcus* as the most abundant genus in all clinical situations (Fig. 4). *Haemophilus*, *Moraxella* and *Pseudomonas* genera, which include the main PPM in COPD, were also frequently recovered, but showed a high variability among the four assessed clinical situations. *Pseudomonas* genus was the most common in stable *PA*-colonised patients, *Haemophilus* being the genus more often found in non-*PA*-colonised patients and during exacerbation, independently of the previous history of *P. aeruginosa* colonisation.

Variability in bronchial microbiome during exacerbation

Baseline variability of the bronchial microbiome in severe COPD was determined calculating the percentage of variation

for all examined genera in two sputum samples obtained consecutively (>2 weeks) during stability from 2 patients (relative abundance consecutive sample – relative abundance baseline sample \times 100), and was below 20 % for all the genera studied ($n=96$; Fig. 5a). Changes over this value were accordingly considered abnormal for subsequent analysis. The same approach was followed for the calculation of the variability of every genus in the bronchial flora when exacerbation appears in 13 patients with paired samples from stability and exacerbation. Genera with increases over 20 % in exacerbations included *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Achromobacter* and *Corynebacterium*, all of which include recognised PPMs. The increase observed for specific genera when exacerbation symptoms appear paralleled a decrease of the same magnitude in the relative abundance for genera unrelated to this exacerbation, without major changes in the remaining bronchial microbiota. Exacerbation-related variability in PA-colonised and non-PA-colonised patients was similar, and did not show statistically significant differences in the genera that showed increases in their relative abundance over 20 % ($p>0.05$, Chi-squared test; Fig. 5b, c).

Increases over 20 % in specific genera identified by 16SrRNA gene pyrosequencing were compared with culture results during exacerbation in the same sample, in order to determine the sensitivity of microbiological cultures for detecting the identified changes in the bronchial microbiome. In 5 out of 13 patients (38.5 %) microbial cultures did not show PPMs whose genera increased over 20 % from baseline at pyrosequencing. Three of these patients had negative sputum cultures during exacerbation and 1 patient showed a positive culture for *P. aeruginosa*, while an increase over 20 % was detected for *Moraxella* genus at pyrosequencing without significant changes in *Pseudomonas* genus abundance. In the fifth patient, an increase in *Achromobacter* genus was shown by the culture-independent technique, while the sputum culture was positive for *Stenothropomonas maltophilia* and *Alcaligenes* spp. In 2 exacerbated patients positive sputum cultures showed a PPM previously recovered during stability. These patients were considered to be colonised, and their pyrosequencing results did not show an increase in abundance over 20 % for any genera (Table 3).

Discussion

This study analysed the microbiome of severe COPD patients through amplification and pyrosequencing of the 16S rRNA gene. Assessing sputum samples obtained during stability from patients colonised by *P. aeruginosa* and non-PA-colonised patients, we observed that the microbiome of PA-colonised COPD patients showed an expected increase in the *Pseudomonas* genus. Differences in the bronchial microbiome

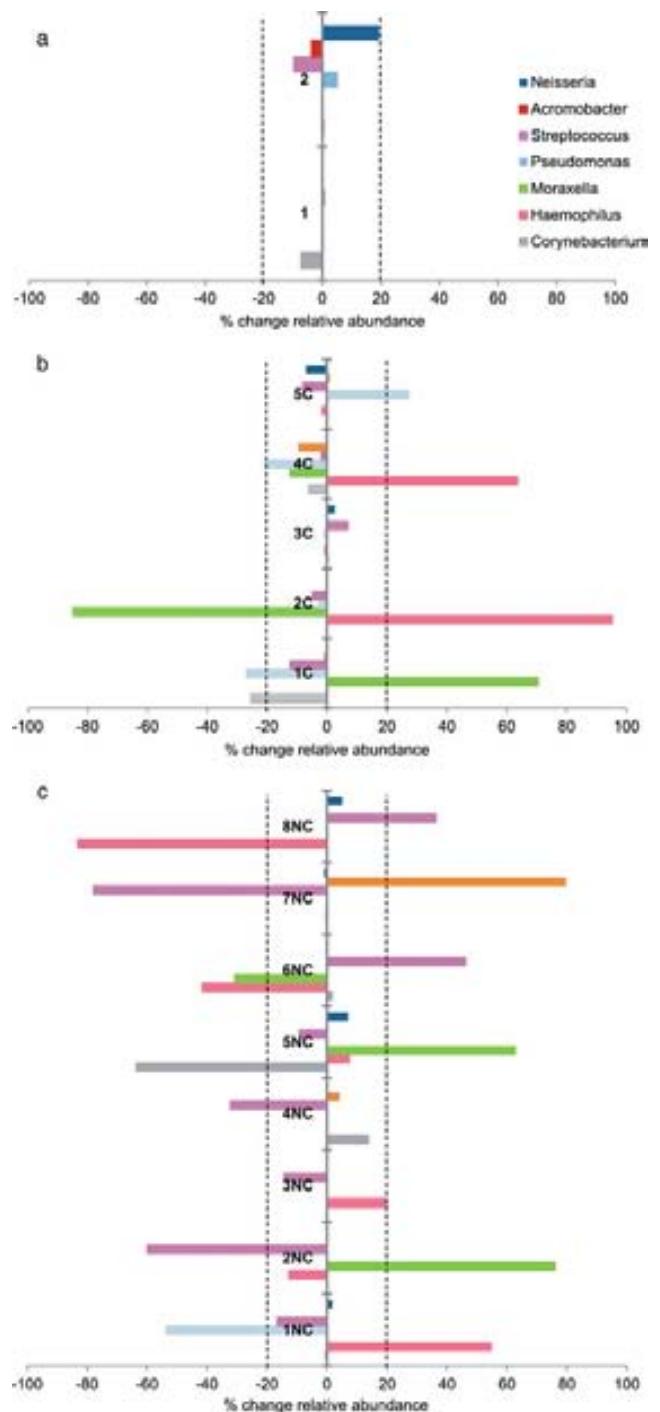


Fig. 5 Percentage of change in the relative abundance of genera. Only genera with a percentage of change over 20 % in at least one patient are represented. **a** Percentage of variability in the genera observed in consecutive samples recovered in stable situation ($n=2$); **b** Percentage of variability in exacerbation in patients colonised by *P. aeruginosa* using the baseline stability sample as the reference ($n=5$); **c** Percentage of variability in exacerbation in non-PA-colonised patients ($n=7$). Dark blue: *Neisseria*; orange: *Achromobacter*; purple: *Streptococcus*; light blue: *Pseudomonas*; green: *Moraxella*; pink: *Haemophilus*; grey: *Corynebacterium*

between PA-colonised and non-PA-colonised patients disappeared during exacerbation, a clinical situation that prompted

Table 3 Changes in the microbiome during exacerbation detected by traditional cultures and 16S pyrosequencing. Only the increases above 20 % are detailed in the pyrosequencing data

Patients	Standard culture positive	16S pyrosequencing abundance increase >20 %	16S pyrosequencing additional relevant information
Colonised patients			
1	<i>P. aeruginosa</i>	↑ <i>Moraxella</i>	PPM not identified by culture
2	<i>H. influenzae</i>	↑ <i>Haemophilus</i>	No additional information
3	<i>P. aeruginosa</i>	Only changed <20 %	Colonising <i>P. aeruginosa</i>
4	<i>H. influenzae</i>	↑ <i>Haemophilus</i>	No additional information
5	Negative	↑ <i>Pseudomonas</i>	PPM not identified by culture
Non-PA-colonised patients			
1	<i>H. parainfluenzae</i>	↑ <i>Haemophilus</i>	No additional information
2	<i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i>	↑ <i>Moraxella</i>	No additional information
3	<i>H. influenzae</i>	↑ <i>Haemophilus</i>	No additional information
4	<i>S. pneumoniae</i>	Only changed <20 %	Colonising <i>S. pneumoniae</i>
5	Negative	↑ <i>Moraxella</i>	PPM not identified by culture
6	<i>S. pneumoniae</i>	↑ <i>Streptococcus</i>	No additional information
7	<i>S. maltophilia</i> <i>Alcaligenes</i> spp.	↑ <i>Achromobacter</i>	PPM not identified by culture
8	Negative	↑ <i>Streptococcus</i>	PPM not identified by culture

a change in the microbiome of patients chronically colonised by this PPM to a bacterial flora equivalent to that found in exacerbated non-PA-colonised patients. Besides, we found that some genera increased their relative abundance during exacerbation, including *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Achromobacter* and *Corynebacterium*, all of which include recognised PPMs, and this change was equivalent in PA-colonised and non-PA-colonised patients. Simultaneous sputum cultures did not identify genera increasing their abundance in one third of the exacerbations appearing in severe COPD patients.

We found that the bronchial tree of severe COPD patients shows a wide range of prevalent genera, in agreement with previous reports in healthy subjects and patients with moderate disease [18, 19, 32]. Thus, the bacterial diversity in the lower airway in severe COPD individuals without signs of infection was much higher than previously anticipated, with a complex bacterial community that includes *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Gemella*, *Rothia* and *Achromobacter* as the main recovered genera. *Pseudomonas* was the most common genus in stable patients who have shown previous colonisation by *P. aeruginosa*, and *Haemophilus* is the genus more often found in non-PA-colonised severe patients.

In spite of the chronic presence of *P. aeruginosa* in the bronchial tree of a subgroup of severe COPD patients, we found no statistically significant differences in Chao1 and Shannon biodiversity parameters between PA-colonised and non-PA-colonised patients, suggesting that the presence of *P. aeruginosa* in the respiratory tract of these patients does

not modify the diversity of the bronchial microbiome. The conservation of a diverse microbiota is related to epithelial integrity, immunoregulation and colonisation resistance [19, 33–35] and shifts in the microbial community composition may compromise respiratory health and contribute to disease progression. Recent studies based on culture-independent sequencing technologies have reported well-defined microbiome changes in the mucosa of diverse chronic diseases, such as cystic fibrosis and inflammatory bowel diseases, among others [36]. The lack of differences in the bronchial microbiome observed in PA-colonised and non-PA-colonised patients in our study suggests that the bronchial colonisation by this PPM is not associated with the appearance of significant alterations in the bronchial flora in severe COPD patients.

We found that the bacterial community obtained during exacerbation in patients colonised by *P. aeruginosa* changes to a flora showing a close similarity with the microbiome found in non-PA-colonised severe COPD patients during exacerbation, suggesting that acute episodes in PA-colonised patients might be attributable to common PPMs instead of the colonising PPM. In severe COPD, *P. aeruginosa* may be recovered from sputum cultures obtained during stability periods [3–8]. Patients with persistent colonisation by *P. aeruginosa* have a worse prognosis than non-colonised patients when exacerbation symptoms appear [8], and require prompt treatment. Accordingly, antibiotic treatments targeting *P. aeruginosa* are currently recommended for severe patients with frequent episodes of exacerbation with this clinical profile [10]. In adults with COPD this approach is justified by the features that this disease shares with cystic fibrosis, in which

P. aeruginosa causes chronic colonisation and is associated with significant morbidity and mortality [37–39]. Extrapolating observations from cystic fibrosis to COPD must be done with caution, however, because the carriage patterns of *P. aeruginosa* differ substantially in the two diseases [11, 40, 41]. Our findings suggest that exacerbation symptoms in PA-colonised patients are mainly related to PPMs that are a frequent cause of exacerbation in non-PA-colonised COPD patients rather than *P. aeruginosa* infection.

The variability in the abundance of genera in bronchial secretions observed during stability and exacerbation periods was assessed in our study, and stable severe COPD patients showed variabilities below 20 % for all genera in the absence of exacerbation symptoms. When exacerbation appears, this value increases well above the stability reference level for genera such as *Haemophilus*, *Moraxella* and *Streptococcus*, all of which include pathogenic species. These findings confirm that most cases of infectious exacerbation in severe COPD patients are due to PPMs, which are a common cause of acute symptoms in COPD, without significant differences between PA-colonised and non-PA-colonised patients. This finding suggests that antibiotic treatments prescribed for exacerbations in PA-colonised patients need to target common PPMs instead of the colonising PPM in the first instance. Interestingly, the increases in relative abundance observed in specific genera during exacerbation periods in the present study paralleled clear decreases of a similar magnitude in other genera that also included PPMs, without significant changes in the baseline flora found in the bronchial tree, again with a similar pattern in PA-colonised and non-PA-colonised patients.

The exacerbation-related changes identified in the bronchial microbiome during exacerbation were not identified by simultaneous microbiological cultures in one third of the patients in our study. Although traditional microbiological culture is the gold standard technique for the identification of bronchial colonisation [42], it has some limitations. A significant number of microorganisms do not grow in selective cultures, and fast-growing bacteria can mask other clinically important bacteria in the sample [43]. PCR amplification of 16S rRNA gene identifies the real composition of the lung microbiome [42] and can help us to understand the association between the microbiome changes and the acute stages of the disease.

Limitations of the study are the sample size, the use of sputum samples for the assessment of bronchial secretions and the absence of testing for viral infection. Enrolled patients were representative of the hospital-managed population with severe COPD, and did not suffer from severe comorbidities. Sputum was used to examine the bronchial microbiome because these samples can be obtained easily and non-invasively and the guidelines for the procedure include quality criteria. Although the sputum may be contaminated by bacterial flora of the oropharynx and the oral cavity, the microbiome composition that we have found in severe COPD patients is quite

similar to that of previous reports in healthy controls and COPD patients based on the use of bronchial brushing and bronchoalveolar lavage for the sampling of bronchial secretions [18, 19]. We assumed, accordingly, that sputum is a representative sample for the study of the microbiome of bronchial secretions in severe COPD patients, with the additional advantage that the results obtained can be easily correlated with sputum culture. Viral infection in COPD patients can modify the bronchial microbiome [44] and changes in the microbiome detected during exacerbation may be partly influenced by the coexistence of infective virus in the bronchial tree.

Conclusions

Our data confirm that a rich bronchial microbiome is found in bronchial secretions from stable COPD patients with severe disease, which includes genera with well-known PPMs that are unusual in the normal population. In severe patients colonised by *P. aeruginosa* the bacterial community showed differences with regard to non-colonised patients in their stability periods, but at times of exacerbation their microbial profile changed to a flora that included PPMs and was equivalent to the bronchial microbiome found in non-colonised patients during exacerbation. These findings argue against the need for differentiated antibiotic approaches to exacerbation in severe COPD patients colonised by *P. aeruginosa*, a suggestion that must be confirmed in larger cohorts of patients.

Acknowledgements We thank Michael Maudsley for providing an outline for this manuscript and support in editing and journal styling.

This work was supported by Sociedad Catalana de Neumología; Fundació Catalana de Neumologia; Fundació Parc Tauli; Marató de TV3; Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica; Ministerio de Economía y Competitividad (Spain; SAF2012-31187); Generalitat Valenciana (Spain; Prometeo/2009/092) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). CIBERES is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. VPB has a postdoctoral contract in health research improvement “Sara Borrell” from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA (2000) Association between airway bacterial load and markers of airway

- inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* 109(4):288–295
2. Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF (2002) New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 347(7):465–471
 3. Soler N, Torres A, Ewig S, Gonzalez J, Celis R, El-Ebiary M, Hernandez C, Rodriguez-Roisin R (1998) Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 157(5 Pt 1):1498–1505
 4. Eller J, Ede A, Schaberg T, Niederman MS, Mauch H, Lode H (1998) Infective exacerbations of chronic bronchitis: relation between bacteriologic etiology and lung function. *Chest* 113(6):1542–1548
 5. Rosell A, Monso E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, Zalacain R, Morera J, Torres A (2005) Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 165(8):891–897
 6. Lieberman D (2003) Pseudomonas infections in patients with COPD: epidemiology and management. *Am J Respir Med* 2(6):459–468
 7. Garcia-Vidal C, Almagro P, Romani V, Rodriguez-Carballeira M, Cuchi E, Canales L, Blasco D, Heredia JL, Garau J (2009) Pseudomonas aeruginosa in patients hospitalised for COPD exacerbation: a prospective study. *Eur Respir J* 34(5):1072–1078
 8. Miravittles M, Espinosa C, Fernandez-Laso E, Martos JA, Maldonado JA, Gallego M (1999) Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. Study Group of Bacterial Infection in COPD. *Chest* 116(1):40–46
 9. Rakhimova E, Wiehlmann L, Brauer AL, Sethi S, Murphy TF, Tummeler B (2009) Pseudomonas aeruginosa population biology in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 200(12):1928–1935
 10. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Huchon G, Ieven M, Orqvist A, Schaberg T, Torres A, van der Heijden G, Verheij TJ (2005) Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. *Eur Respir J* 26(6):1138–1180
 11. Murphy TF, Brauer AL, Eschberger K, Lobbins P, Grove L, Cai X, Sethi S (2008) Pseudomonas aeruginosa in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 177(8):853–860
 12. Martinez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martinez JL (2008) Chronic Pseudomonas aeruginosa infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 47(12):1526–1533
 13. Pomares X, Monton C, Espasa M, Casabon J, Monso E, Gallego M (2011) Long-term azithromycin therapy in patients with severe COPD and repeated exacerbations. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 6:449–456
 14. Murphy TF (2008) The many faces of Pseudomonas aeruginosa in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 47(12):1534–1536
 15. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y (2002) Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 46(8):535–548
 16. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Dore J (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 65(11):4799–4807
 17. Sibley CD, Grinwis ME, Field TR, Eshaghrushan CS, Faria MM, Dowd SE, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG (2011) Culture enriched molecular profiling of the cystic fibrosis airway microbiome. *PLoS One* 6(7):e22702
 18. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG (2011) Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 184(8):957–963
 19. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB (2011) Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One* 6(2):e16384
 20. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO (2010) Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 5(1):e8578
 21. Armougom F, Bittar F, Stremmer N, Rolain JM, Robert C, Dubus JC, Sarles J, Raoult D, La Scola B (2009) Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28(9):1151–1154
 22. Updated 2013 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. www.goldcopd.com
 23. Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA (1987) Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 106(2):196–204
 24. Canton R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, Alvarez A, Salcedo A, Oliver A, Garcia-Quetglas E (2005) Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 11(9):690–703
 25. Vendrell M, de Gracia J, Oliveira C, Martinez MA, Giron R, Maiz L, Canton R, Coll R, Escribano A, Sole A (2008) Diagnosis and treatment of bronchiectasis. Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery. *Arch Bronconeumol* 44(11):629–640
 26. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75(23):7537–7541
 27. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Tumbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7(5):335–336
 28. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12(6):R60
 29. Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat* 11:265–270
 30. Shannon CE (1997) The mathematical theory of communication. 1963. *MD Comput* 14(4):306–317
 31. Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 27:325–349
 32. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, Flores SC, Fontenot AP, Ghedin E, Huang L, Jablonski K, Kleerup E, Lynch SV, Sodergren E, Twigg H, Young VB, Bassis CM, Venkataraman A, Schmidt TM, Weinstock GM (2013) Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 187(10):1067–1075
 33. Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC (2007) The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc* 4(7):512–521
 34. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55(2):205–211
 35. Sartor RB (2008) Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(43):16413–16414

36. Frank DN, Zhu W, Sartor RB, Li E (2011) Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses. *Trends Microbiol* 19(9):427–434
37. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW (2001) Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 183(3):444–452
38. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL (2002) *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 34(2):91–100
39. West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, Splaingard MJ, Farrell PM (2002) Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA* 287(22):2958–2967
40. Dal Negro R, Micheletto C, Tognella S, Visconti M, Turati C (2008) Tobramycin nebulizer solution in severe COPD patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*: effects on bronchial inflammation. *Adv Ther* 25(10):1019–1030
41. Orriols R, Roig J, Ferrer J, Sampol G, Rosell A, Ferrer A, Vallano A (1999) Inhaled antibiotic therapy in non-cystic fibrosis patients with bronchiectasis and chronic bronchial infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir Med* 93(7):476–480
42. Han MK, Huang YJ, Lipuma JJ, Boushey HA, Boucher RC, Cookson WO, Curtis JL, Erb-Downward J, Lynch SV, Sethi S, Toews GB, Young VB, Wolfgang MC, Huffnagle GB, Martinez FJ (2012) Significance of the microbiome in obstructive lung disease. *Thorax* 67(5):456–463
43. Morgan XC, Huttenhower C (2012) Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol* 8(12):e1002808
44. Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, Footitt J, Willis-Owen SA, Homola D, Trujillo-Torralbo MB, Elkin S, Kon OM, Cookson WO, Moffatt MF, Johnston SL (2013) Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 188(10):1224–1231

Online supplementary file

Bronchial microbiome of severe COPD patients colonised by *Pseudomonas aeruginosa*.

Laura Millares, Rafaela Ferrari, Miguel Gallego, Marian Garcia-Nuñez, Vicente Pérez-Brocal, Mateu Espasa, Xavier Pomares, Concepción Monton, Andrés Moya, Eduard Monsó.

Methods

Design and population

Exclusion criteria were age <40 yrs, hospital admission for respiratory symptoms in the previous six months, diagnosis of asthma, cystic fibrosis, neoplasia or bronchiectasis, and/or treatment with oral corticosteroids or immunosuppressive drugs for any reason. Patients who changed their smoking habits and bronchodilator treatment during follow-up were also excluded.

Clinical variables

Functional characteristics were assessed at baseline and included forced spirometry and reversibility testing, six minute walking test [1], body mass index (BMI) and BODE index [2]. Forced vital capacity and FEV₁ were measured with the same dry rolling seal spirometer (Sibelmed, Sibelgroup, Barcelona, Spain), and expressed as absolute values (mL) and percentages of the reference values obtained from age- and height-adjusted selected volunteers from the Barcelona province [3].

Microbiology

Sputum appearance was determined according to the Murray-Washington criteria [4] and samples with >25 leucocytes per field were considered indicative of a neutrophilic inflammatory response and suitable for culture [5]. Sputum samples were then weighed, processed with an equal volume of a 1:10 dilution of dithiothreitol (DTT) (Sputasol, Oxoid Ltd., Hants, UK), and cultured according to standard methods [6]. Microbiological processing included determination of microbial typology and load through serial dilutions and culture in selective media for PPMs,

with quantitative cultures expressed as colony-forming units (cfu) per milliliter. A positive sputum culture for PPMs at a concentration of 10^2 colony-forming units (cfu) per milliliter (mL) or greater was considered positive, and following Cabello *et al* [7], PPMs were defined as those microorganisms recognized as agents causing respiratory infections, regardless of whether they belonged to the gastrointestinal or oropharyngeal flora. Remaining sputum after standard culture was stored at -80°C for further determinations.

Results

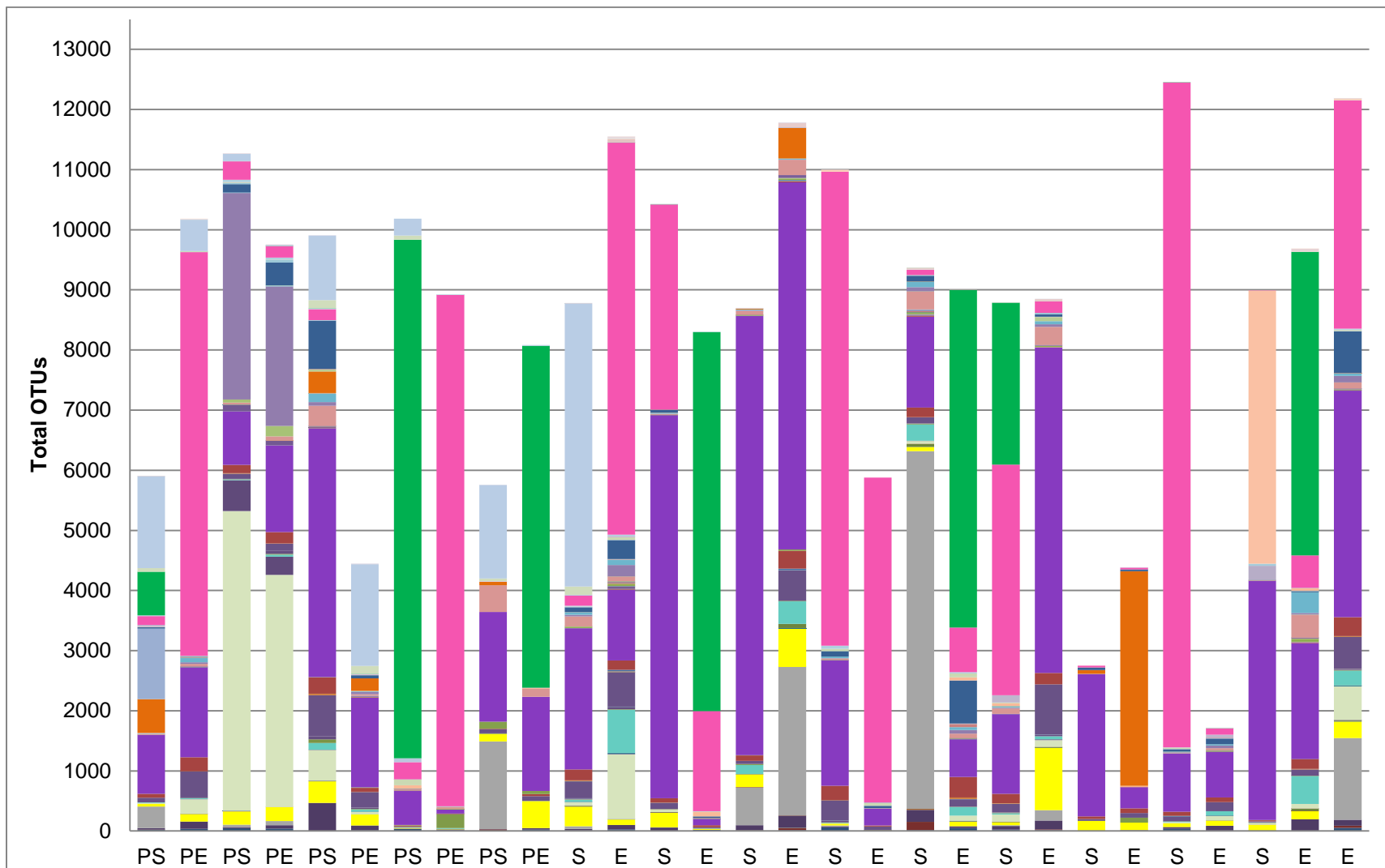


Figure 1. Abundance of the detected OTUs at genus level in the samples analysed before removing OTUs present in only one sample. (PS, colonised by *P. aeruginosa* in stability; PE colonised by *P. aeruginosa* in exacerbation; S, non-PA-colonised stability; E, non-PA-colonised in exacerbation).

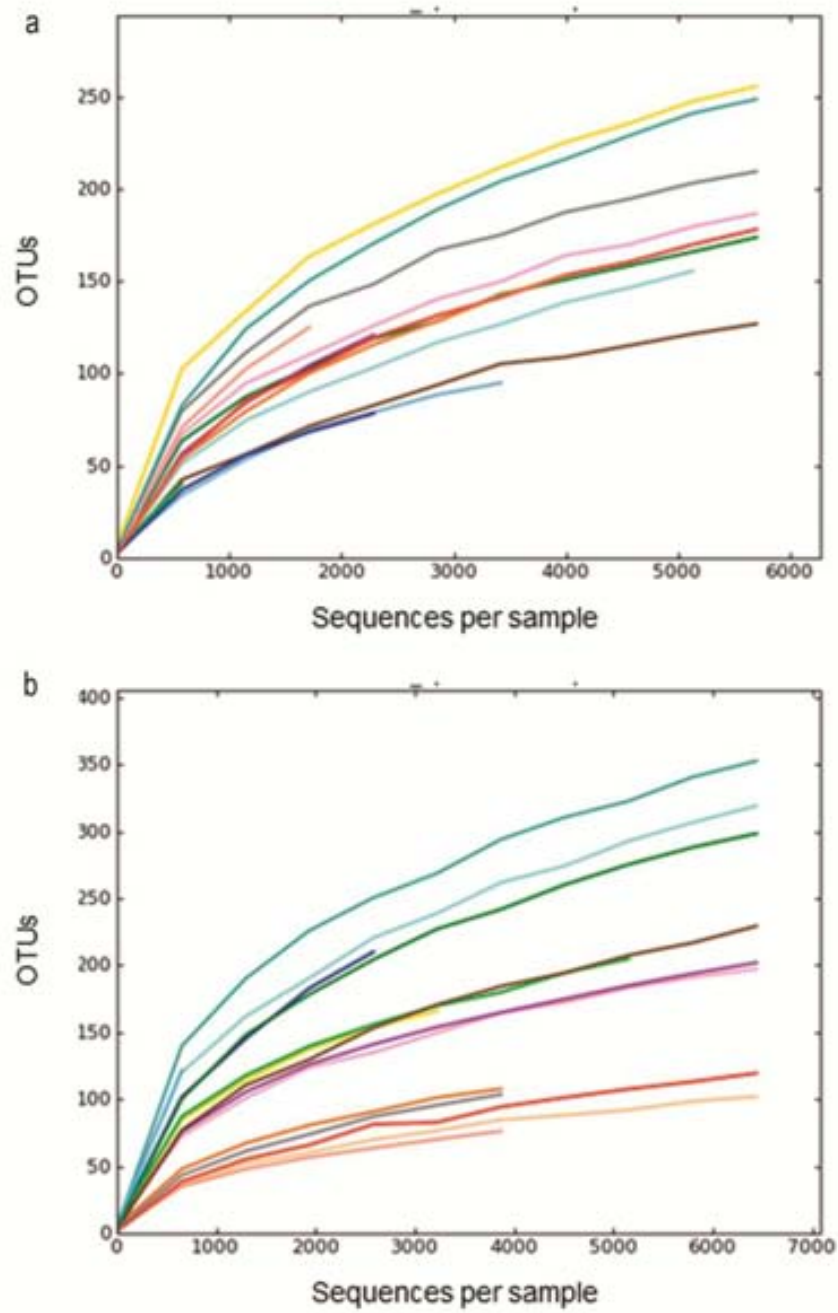


Figure 2. Rarefaction curves from stable (a) and exacerbated (b) samples. Each curve represents one sample and indicates the count of single OTUs found in this sample at each sequencing depth.

References

1. **Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **152**(3):1107-1136.
2. 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**(10):1005-1012.
3. Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, Casan P, Sans S: **Spirometric reference values from a Mediterranean population.** *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986, **22**(3):217-224.
4. Murray PR, Washington JA: **Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum.** *Mayo Clin Proc* 1975, **50**(6):339-344.
5. Van Scoy RE: **Bacterial sputum cultures. A clinician's viewpoint.** *Mayo Clin Proc* 1977, **52**(1):39-41.
6. Balows A: **Manual of Clinical Microbiology**, 5th edn: Washington DC, American Society of Microbiology 1991.
7. Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig de la Bellacasa J, Xaubet A, Gonzalez J, Agusti C, Soler N: **Bacterial colonisation of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study.** *Eur Respir J* 1997, **10**(5):1137-1144.

ANEXO II

**Otras publicaciones y comunicaciones a congresos del
doctorando relacionadas con la temática de la tesis**

Otras Publicaciones

1. Severity-related changes of bronchial microbiome in COPD. García-Núñez M, **Millares L**, Pomares J, Ferrari R, Perez-Brocal V, Gallego M, Espasa M, Moya A, Monsó E. *Under review*.
2. Effect of bronchial colonisation on airway and systemic inflammation in stable COPD. Marin A, Garcia-Aymerich J, Sauleda J, Belda J, **Millares L**, García-Núñez M, Serra I, Benet M, Agustí A, Antó JM, Monsó E; PAC-COPD Study Group. COPD. 2012 Apr;9 (2):121-30.
3. Colour of sputum is a marker for bacterial colonisation in chronic obstructive pulmonary disease. Miravittles M, Marín A, Monsó E, Vilà S, de la Roza C, Hervás R, Esquinas C, García M, **Millares L**, Morera J, Torres A. Respir Res. 2010 May 14;11:58.
4. Efficacy of moxifloxacin in the treatment of bronchial colonisation in COPD. Miravittles M, Marín A, Monsó E, Vilà S, de la Roza C, Hervás R, Esquinas C, García M, **Millares L**, Morera J, Torres A. Eur Respir J. 2009 Nov;34(5):1066-71

Comunicaciones a congresos nacionales

1. **L. Millares**, A. Marín, J. Garcia-Aymerich, J. Sauleda, S. Barea, M. García, E. Monsó, J.M. Antó. Respuesta inmune específica a *Haemophilus influenzae* en EPOC estable. Congreso de la Sociedad Española de Pneumología y Cirugía Torácica. A Coruña, Junio 2010.
2. **L. Millares**, A. Marín, J. Garcia-Aymerich, J. Sauleda, S. Barea, M. García, E. Monsó, J.M. Antó. Respuesta inmune específica a *Haemophilus influenzae* en EPOC estable. Congreso de la Sociedad Catalana de Pneumología. Girona, Marzo 2009.
3. A.Marín-Tapia, E.Monsó, M.Miravittles, C.de la Roza, S.Vila, **L.Millares**, R.Hervas, M.García, G.Tirado, F.Ros, A.Torres, y J.Morera. Análisis de la eficacia de moxifloxacino en el tratamiento de la colonización bronquial en EPOC mediante tipaje molecular: Ensayo clínico randomizado, doble ciego. Congreso de la Sociedad Española de Pneumología y Cirugía Torácica. Barcelona, Junio 2007.

Comunicaciones a congresos internacionales

1. **L. Millares**, M. García-Nuñez, R. Ferrari, M. Gallego, V. Perez-Brocal, C. Monton, X. Pomares, A. Moya, E. Monsó. Bronchial microbiome and lung function impairment. Barcelona Boston Lung Conference on Airway Diseases. Barcelona, Enero 2014.
2. M. Garcia-Nuñez, **L. Millares**, V. Perez-Brocal, R. Ferrari, M. Gallego, C. Monton, J. Pomares, M. Espasa, A. Mira, A. Moya, E. Monso. Severity-related microbiome changes in COPD. Congreso de la European Respiratory Society (ERS). Barcelona, Septiembre 2013.
3. M. Garcia-Nuñez, **L. Millares**, R. Ferrari, V. Perez-Brocal, M. Gallego, J. Pomares, C. Monton, M. Espasa, A. Moya, E. Monso. Etiology of exacerbations in severe COPD patients with bronchial chronic colonization by pseudomonas. . Congreso de la European Respiratory Society (ERS). Barcelona, Septiembre 2013.
4. R. García-López., **L. Millares**, M. Garcia-Nuñez, E. Monso, A. Moya, V. Pérez-Brocal. Metagenomic Analysis of the Viral and Microbial Communities in two chronic Diseases. Cell Symposia: Microbiome and Host Health. Lisboa, Mayo 2013.
5. V. Diaz-Ochoa, **L. Millares**, V. Pérez-Brocal. Metagenomic Analysis of the Intestinal Virome from Crohn's Patients and a Control Population. ABRCMS Congress. San José, California, Noviembre 2012.
6. **L. Millares**, A. Marín, J. García-Aymerich, J. Sauleda, S. Barea, M. García-Núñez, JM. Antó, E. Monsó. Specific immune response against *Haemophilus influenzae* in stable COPD. Congreso de la European Respiratory Society (ERS). Barcelona, Septiembre 2010.
7. **L. Millares**, A. Marín, J. García-Aymerich, J. Belda, J. Sauleda, S. Barea, M. García-Nuñez, M. Benet, JM. Antó, E. Monsó. Effect of COPD bronchial colonization in MMP-9:TIMP-1 molar ratio. Congreso de la European Respiratory Society (ERS). Barcelona, Septiembre 2010.
8. A. Marín, E. Monsó, M. Miravittles, **L. Millares**, M. García, C. Esquinas, R. Hervás, T. Torres, J. Morera. Species-specific pattern of bronchial colonization by *H. parainfluenzae* in COPD patients. Congreso de la European Respiratory Society (ERS). Barcelona, Septiembre 2010.

9. JA Torrecilla, J Sauleda, B Cosio, E Monsó, A Noguera, A Rosell, A Iglesias, **L Millares**, N Rodríguez, A Agustí. Systemic inflammation: a link between chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer? Congreso de la European Respiratory Society (ERS). Viena, Septiembre 2009.
10. **L. Millares**, M. Garcia-Nuñez, A. Marin, S. Albertí, M. Sabria, J. Morera, E. Monso. Specific blood immune Response to *Haemophilus* in stable COPD patients. Congreso de la European Respiratory Society (ERS). Berlin, Octubre 2008.
11. A Marín-Tapia, E Monsó, M Miravittles, C de la Roza, **L Millares**, M García, G Tirado-Conde, R Hervás, A. Torres and J Morera. Analysis of the efficacy of moxifloxacin for the treatment of bronchial colonization in COPD patients using microbial molecular typing: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Congreso de la European Respiratory Society (ERS). Berlin, Octubre 2008.
12. A Marín-Tapia, E Monsó, M Miravittles, C de la Roza, **L Millares**, M García, G Tirado-Conde, R Hervás, A. Torres and J Morera. Analysis of the efficacy of moxifloxacin for the treatment of bronchial colonization in COPD patients using microbial molecular typing: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Congreso de la American Thoracic Society (ATS). Toronto, Mayo 2008.
13. A. Marín-Tapia, E. Monsó, M. Miravittles, C. de la Roza, **L. Millares**, M. García, A. Torres and J. Morera. Using of molecular typing for the analysis of efficacy of moxifloxacin for treatment of bronchial colonisation in COPD patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. Congreso de la American Thoracic Society (ATS). San Francisco, Mayo 2007.

*Like the legend of the Phoenix,
all ends with beginnings.*

(Daft punk)

