



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorat en Medicina.
Departament de Medicina. Facultat de Medicina

**COLONITZACIÓ BACTERIANA EN LA MPOC: PAPER DELS
MECANISMES DE DEFENSA DE LA VIA AÈRIA
I NOUS MÈTODES DIAGNÒSTICS**

TESI DOCTORAL presentada per:

LAIA GARCIA BELLMUNT

Directors: **Dr. Oriol Sibila Vidal**

Dr. Vicente Plaza Moral

Tutor: **Dr. Jordi Casademont i Pou**

Barcelona 2016

CERTIFICAT DE DIRECCIÓ

El Dr. Oriol Sibila Vidal, metge adjunt del Servei de Pneumologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i el Dr. Vicente Plaza Moral, Professor Titular del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap de Servei de Pneumologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

CERTIFIQUEN:

Que la Tesis Doctoral que duu per títol "COLONITZACIÓ BACTERIANA EN LA MPOC: PAPER DELS MECANISMES DE DEFENSA DE LA VIA AÈRIA I NOUS MÈTODES DIAGNÒSTICS", presentada per la Laia Garcia Bellmunt per optar al grau de Doctor en Medicina, ha estat realitzada sota la seva direcció. Un cop finalitzada assoleix els requisits formals i científics per procedir a la seva presentació en públic i ser avaluada pel Tribunal corresponent.

I perquè quedi constància als efectes oportuns, signen la present:

Directors: **Dr. Oriol Sibila Vidal**

Dr. Vicente Plaza Moral

Tutor: **Dr. Jordi Casademont i Pou**

AGRAÏMENTS

Agraeixo al Dr. Oriol Sibila Vidal, director de tesi i mentor en el meu camí per la recerca i per la Pneumologia, *moltes gràcies per confiar en mi i moltes gràcies per tot!* Al Dr. Vicente Plaza Moral, com a director de tesi i com a Cap de Servei per permetre'm dur a terme aquest projecte.

Al tutor d'aquest projecte de tesi, el Dr. Jordi Casademont i Pou.

A la Unitat de Broncoscòpia, especialment per la seva paciència al Dr. Alfons Torrego, a la Cristina i la Maribel. Al Jordi Giner per la seva gran ajuda.

Als companys de l'Hospital de Dia de Pneumologia, en especial a la Dra. Ingrid Solanes, a la Ludi i a la Marina.

Al Dr. Abilio Castellano, per la seva ajuda i suport desinteressat. *Gracias por confiar en mí, por tus buenos consejos y por apoyarme.*

A la Dra. Mercè Mayos, que ha tutoritzat els meus passos per la Pneumologia.

A tots els companys del Servei de Pneumologia de l'Hospital de Sant Pau, als meus R grans i R petits pel temps compartit, als becaris i companys de "la 4a".

Al Dr. Tomàs Franquet i a la Dra. Ana Gimenez, per la seva col·laboració en el diagnòstic per la imatge.

Als companys del laboratori de Microbiologia i en especial al Dr. Ferran Sanchez-Reus.

Al grup dels companys del laboratori d'Immunologia, la Dra. Sílvia Vidal i a l'Eder Freddy Mateus per ensenyar-me i ajudar-me amb la part de processament i estudi de les mostres.

Als meus nous companys del Servei de Pneumologia de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus, pel camí que queda per recórrer junts.

A tots aquells pacients que han participat i han fet possible aquesta tesi.

A la meva família i als meus amics, en especial als meus pares pel recolzament que m'han donat. *Vosaltres sou part d'aquesta tesi.*

Al Jordi, *perquè sempre hi ets i hi seràs, t'estimo.*

A tots, moltes gràcies.

PRESENTACIÓ

Aquesta Tesi Doctoral representa el resultat d'un estudi dut a terme al Servei de Pneumologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i de l'Institut de Recerca Biomèdica de Sant Pau (IIB Sant Pau), en el marc del programa de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El projecte de tesi ha estat dut a terme sota la supervisió dels Directors de tesi, el Dr. Oriol Sibila Vidal i el Dr. Vicente Plaza Moral Cap de Servei de Pneumologia i sota la tutoria del Dr. Jordi Casademont i Pou.

Els estudis que formen aquesta Tesi Doctoral formen part d'una línia d'investigació dirigida a conèixer els mecanismes implicats en la colonització bacteriana en la MPOC i estudiar possibles nous mètodes pel diagnòstic no invasiu de dita colonització de la via aèria.

ÍNDEX

ÍNDIX

LLISTA D'ABREVIACIONS	15
ÍNDIX DE TAULES I FIGURES	19
1. INTRODUCCIÓ	23
2. ANTECEDENTS DEL TEMA	27
2.1. La MPOC	29
2.1.1. La MPOC: la seva importància i el seu impacte sanitari	29
2.2. Colonització bacteriana en la MPOC	32
2.2.1. Colonització bacteriana i inflamació	33
2.2.2. Colonització bacteriana i l'impacte en la malaltia	35
2.3. Els mecanismes de defensa pulmonar i la colonització bronquial	37
2.3.1. Les mucines	40
2.3.2. Els pèptids antimicrobians	42
2.4. Mètodes diagnòstics en la colonització bronquial en la MPOC: utilitat d'un nas electrònic i de la TACAR	44
2.4.1. La TAC d'alta resolució	44
2.4.2. El nas electrònic	50
3. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE LA TESI	55
3.1. Justificació general	57
3.2. Justificació i objectius de l'estudi 1	58
3.2.1. Objectius primaris	58
3.2.2. Objectius secundaris	58
3.3. Justificació i objectius de l'estudi 2	59
3.3.1. Objectius primaris	59
3.3.2. Objectius secundaris	59
3.4. Justificació i objectius de l'estudi 3	60
3.4.1. Objectius primaris	60
3.4.2. Objectius secundaris	60
4. MATERIAL I MÈTODES	61
4.1. Material i mètodes de l'estudi 1	63
4.1.1. Disseny de l'estudi	63
4.1.2. Subjectes de l'estudi	63

4.1.3. Caracterització clínica i funcional	64
4.1.4. Avaluació microbiològica	64
4.1.5. Espot induït	65
4.1.6. Mostres endoscòpiques	65
4.1.7. Determinació dels nivells de mucines, alfa-1-defensina i IL-6	66
4.1.8. Anàlisi estadístic	66
4.2. Material i mètodes de l'estudi 2	67
4.2.1. Disseny de l'estudi	67
4.2.2. Subjectes de l'estudi	67
4.2.3. Caracterització clínica i funcional	67
4.2.4. Avaluació microbiològica	68
4.2.5. Mostres endoscòpiques	68
4.2.6. L'adquisició de la imatge radiològica	68
4.2.7. Els patrons radiològics mitjançant TACAR	68
4.2.8. Anàlisi estadístic	69
4.3. Material i mètodes de l'estudi 3	69
4.3.1. Disseny de l'estudi	69
4.3.2. Subjectes de l'estudi	69
4.3.3. Caracterització clínica i funcional	70
4.3.4. Avaluació microbiològica	70
4.3.5. Mostres endoscòpiques	70
4.3.6. Mesura dels COVs mitjançant el nas electrònic	70
4.3.7. Anàlisi dels patrons de COVs	71
5. RESULTATS	73
5.1. Resultats de l'estudi 1	75
5.1.1. Característiques dels subjectes	75
5.1.2. Característiques microbiològiques	75
5.1.3. Nivells de mucines	76
5.1.4. Marcadors d'inflamació i alfa-1-defensina a la via aèria	76
5.1.5. Correlació entre els nivells de mucines, funcionalisme pulmonar i inflamació de la via aèria	77
5.2. Resultats de l'estudi 2	83

5.2.1. Característiques dels subjectes	83
5.2.2. Patrons radiològics mitjançant la TACAR	83
5.3. Resultats de l'estudi 3	87
5.3.1. Característiques dels subjectes	87
5.3.2. Característiques microbiològiques	87
5.3.3. Anàlisi de les empremtes olfàctòries	89
6. DISCUSSIÓ	93
6.1. Discussió de l'estudi 1	95
6.2. Discussió de l'estudi 2	100
6.3. Discussió de l'estudi 3	103
7. CONCLUSIONS	107
7.1. Conclusions de l'estudi 1	109
7.2. Conclusions de l'estudi 2	109
7.3. Conclusions de l'estudi 3	109
8. BIBLIOGRAFIA	111
9. ANNEXE	123
9.1. Annexa I: Publicacions originals incloses en la Tesi:	125
- Article original: <i>Identification of airway bacterial colonization by an electronic nose in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.</i>	127
- Article original: <i>Airway MUC2 is decreased in severe COPD patients with bacterial colonization.</i>	135

LLISTA D'ABREVIACIONS

LLISTA D'ABREVIACIONS

ABPA	Aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica
AUROC	<i>Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve</i>
COVs	Compostos orgànics volàtils
BO	Bronquiolitis obliterant
BODE	<i>Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity</i>
BPP	Bactèries potencialment patògenes
B/ PBT	Bronquièctasis/ Engruiximent de la paret bronquial
CI	Corticosteroids inhalats
CMV	Citomegalovirus
COPD	<i>Chronic Obstrutive Pulmonary Disease</i>
CVA	<i>Cross-Validated Accuracy</i>
DA1AT	Dèficit d'alfa-1-antitripsina
DE	Desviació estàndard
DLCO	Capacitat de difusió de monòxid de carboni
E	Emfisema
ECP	<i>Eosinophil cationic protein</i>
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
e-nose	Nas electrònic
FEV₁	<i>Forced Expiratory Volume in One Second</i>
FQ	Fibrosi quística
FVC	Capacitat Vital Forçada
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
hBD	Beta-defensina
hCAP	Catelicidina
HNP	<i>Human neutrophil peptides</i>
IC	Interval de confiança
IL	Interleucines
IgA	Immunoglobulina A
IMC	Índex de massa corporal

LABA	<i>Long acting beta-agonists</i>
LAMA	<i>Long-acting muscarinic antagonists</i>
LLII	Lòbuls inferiors
LLSS	Lòbuls superiors
LPS-BP	<i>Lipopolisacàrid binding-protein</i>
LTB4	Leucotriè B4
MPOC	Malaltia pulmonar obstructiva crònica
MPO	Mieloperoxidasa
MMP-9	<i>Active matrix metalloproteinase-9</i>
MUC	Mucina
NE-A1AT	<i>Neutrophil elastase/anti-neutrophil elastase complex</i>
NS	no significativa
PAMs	Pèptids antimicrobians
PB	Paret bronquial
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Proteïna C reactiva
PFR	Proves funcionals respiratòries
PJ	Pneumocystis jirovecii
RBA	Rentada broncoalveolar
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
RP	<i>Raspallat protegit</i>
rpm	Revolucions per minut
SABA	<i>Short acting beta-agonists</i>
SEPAR	Sociedad Española de Neumología
SLPI	<i>Secretory leukoprotease inhibitor</i>
TACAR	Tomografia axial computeritzada d'alta resolució.
TC	Tomografia Computeritzada
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1</i>
TM6'	Test de la marxa dels 6 minuts
TNF- α	Factor de necrosi tumoral alfa
UFC	Unitats formadores de colònies

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

INDEX DE TAULES I FIGURES

INDEX DE TAULES

- Taula 1.** Estudis sobre colonització i inflamació bronquial en la MPOC
- Taula 2.** Factors humorals de l'immunitat innata
- Taula 3.** Alteració del nivell de mucines secretores en diferents patologies respiratòries
- Taula 4.** Troballes TACAR en les infeccions pulmonars
- Taula 5.** Troballes en la TACAR en l'estudi dels pacients amb MPOC
- Taula 6.** Característiques clíniques i demogràfiques dels pacients amb MPOC
- Taula 7.** Bactèries potencialment patògenes i càrrega bacteriana aïllades en RP en ordre de freqüència
- Taula 8.** Nivells en RBA i esput de les mucines secretores i alfa-defensina de la via aèria de subjectes amb MPOC
- Taula 9.** Característiques clíniques i demogràfiques dels pacients amb MPOC
- Taula 10.** Troballes en la TACAR dels diferents signes radiològics d'infecció pulmonar en pacients amb MPOC (colonitzats i no colonitzats)
- Taula 11.** Troballes radiològiques en els subjectes amb MPOC colonitzats per ordre de freqüència
- Taula 12.** Característiques clíniques i demogràfiques dels pacients amb MPOC
- Taula 13.** Bactèries potencialment patògenes aïllades en el cultiu del RP
- Taula 14.** *Receiver operating characteristics analysis* de les empremtes olfactòries entre els pacients MPOC colonitzats i no-colonitzats, i controls sans

INDEX DE FIGURES

- Figura 1.** Evolució de les principals causes de mort en les darreres dècades.
- Figura 2.** Prevalença estimada de la MPOC a Espanya: estudis IBEREPOC i EPISCAN.
- Figura 3.** Hipòtesi del cercle-viciós infecció-inflamació en la MPOC.
- Figura 4.** Mecanismes de defensa innats del tracte respiratori.
- Figura 5.** Nas electrònic Cyranose 320.
- Figura 6.** Patró de COVs.
- Figura 7.** Dispositiu de recollida de l'aire exhalat.
- Figura 8.** Nivells de mucines secretores en l'esput i en el RBA de pacients amb MPOC colonitzats i no colonitzats per BPP.
- Figura 9.** Nivells d'alfa-1-defensina en l'esput de pacients amb MPOC.
- Figura 10.** Nivells de IL-6 en l'esput dels subjectes amb MPOC.
- Figura 11.** Relació entre els nivells de MUC2 i IL-6 en l'esput
- Figura 12.** Relació entre els nivells de MUC2 i FEV1
- Figura 13.** Imatges de TACAR de les troballes radiològiques.
- Figura 14.** Gràfic bidimensional de les empremtes olfàctòries mitjançant anàlisi per component principal de pacients amb MPOC colonitzats i no-colonitzats.
- Figura 15.** Àrea sota la corba del model predictiu mitjançant el nas electrònic sobre la colonització bacteriana de la via aèria dels pacients amb MPOC.
- Figura 16.** Gràfic bidimensional de les empremtes olfàctòries mitjançant anàlisi per component principal de pacients amb MPOC colonitzats i controls sans (A), i de pacients amb MPOC no-colonitzats i controls sans (B).

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

La malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) representa un problema sanitari de primer ordre, donada la seva elevada prevalença, ésser una causa creixent de morbi-mortalitat arreu del món i donada l'elevada despesa sanitària que genera (1,2), sobretot en relació a les aguditzacions de la malaltia i a les hospitalitzacions que en resulten.

Diversos estudis amb tècniques invasives han demostrat que el 30-50% dels pacients amb MPOC greu clínicament estables presenten bacteries potencialment patògenes (BPP) a la seva via aèria. Aquests pacients presenten una major inflamació pulmonar i sistèmica, la qual cosa es relaciona amb una major pèrdua de funció pulmonar i amb aguditzacions més freqüents i greus.

En l'actualitat però, no és conegut per què uns pacients amb MPOC són més susceptibles que d'altres a la colonització bacteriana. Per contra, està ben establerta la importància dels mecanismes de defensa innats del sistema respiratori per mantenir la via aèria estèril. Recents estudis han demostrat la importància de diferents proteïnes de la via aèria per a la seva protecció davant d'agents externs entre els quals destaquen les mucines i els pèptids antimicrobians (PAMs).

Per altra banda, el diagnòstic de la presència bacteriana a la via aèria en aquests pacients es realitza mitjançant el cultiu d'esput, que és un mètode no invasiu àmpliament estès en la pràctica clínica diària però que presenta importants limitacions. És per aquest motiu que el present projecte es planteja la utilitat de noves tècniques no invasives: la Tomografia Computeritzada d'Alta Resolució (TACAR) i l'anàlisi de l'aire exhalat mitjançant el nas electrònic (e-nose).

Els objectius principals d'aquesta tesi són per una banda avaluar la relació entre la presència de BPP a la via aèria de pacients amb MPOC i l'expressió de les mucines secretores a la via aèria. Per altra banda, avaluar la utilitat de la

TACAR i del nas electrònic pel diagnòstic no invasiu de la colonització de la via aèria d'aquests pacients.

La hipòtesi de la tesi postula que les mucines (mecanismes de defensa pulmonar) estan alterades en alguns pacients amb MPOC greu, fet que els fa més susceptibles a ser colonitzats per BPP. I que els mètodes diagnòstics no invasius com la TACAR o el nas electrònic poden facilitar-ne el seu diagnòstic.

Per a estudiar els objectius proposats, s'han dissenyat 3 estudis prospectius en els quals s'han inclòs pacients amb MPOC moderada-greu en fase d'estabilitat clínica (> 8 setmanes sense agudització) i sense altra patologia respiratòria concomitant. En tots els pacients es va realitzar l'obtenció de mostra d'esput induït, una fibrobroncoscòpia amb rentada broncoalveolar (RBA) i es van recollir variables demogràfiques i de funcionalisme pulmonar. Es va realitzar l'estudi microbiològic de les mostres respiratòries. En el primer estudi es va realitzar determinació de les mucines, dels pèptids antimicrobians i de les citocines inflamatòries. En el segon estudi, es realitzava l'adquisició d'imatges pulmonars mitjançant la TACAR i determinació de signes radiològics d'infecció. En el darrer estudi es van determinar els compostos orgànics volàtils (COVs) en l'aire exhalat mitjançant el nas electrònic.

2. ANTECEDENTS DELS TEMA

2. ANTECEDENTS DEL TEMA

2.1. LA MPOC

2.1.1. La MPOC: la seva importància i el seu impacte sanitari.

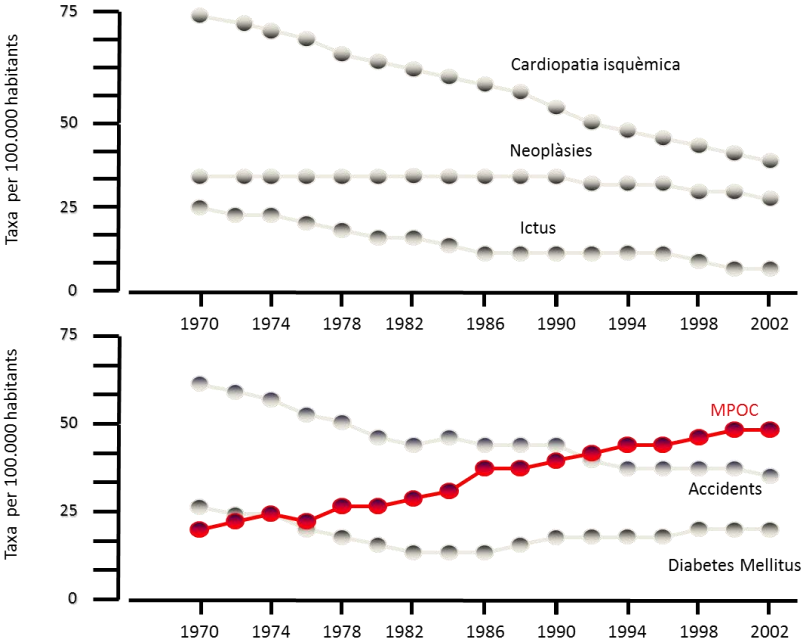
La malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) consisteix en una limitació crònica al flux aeri només parcialment reversible i que està associada amb una resposta inflamatòria augmentada de la via aèria davant partícules o gasos nocius, principalment per l'exposició al fum del tabac. Es tracta d'una malaltia crònica i progressiva que comporta una elevada morbimortalitat (1,3).

En l'actualitat és una malaltia infradiagnosticada que representa un problema sanitari de primer ordre, donada la seva elevada prevalença i ésser una causa creixent de morbi-mortalitat arreu del món. Actualment constitueix la quarta causa de mort en els països del nostre entorn (figura 1) (1-3). Es preveu que la prevalença de la MPOC segueixi en augment i que sigui la tercera causa principal de morbiditat i la sisena causa de mortalitat l'any 2020 (4,5).

A Espanya, diferents estudis poblacionals han detectat una elevada prevalença de la malaltia (figura 2). L'estudi IBERPOC és un estudi epidemiològic multicèntric realitzat en 7 regions diferents d'Espanya i en el qual es van seleccionar de forma randomitzada un total de 4.035 individus (en un rang d'edat d'entre 40 i 69 anys) d'entre una població de 236.412 subjectes. Es va determinar una prevalença del 4.8% (95% interval de confiança (IC): 4.1-5.4%) de la bronquitis crònica, definida com la presència de tos crònica amb expectoració, durant com a mínim 3 mesos per any durant els darrers 2 anys consecutius. Pel que fa a la limitació crònica del flux aeri es va observar una prevalença del 10.6% (95% IC: 9.6-11.5%) (6,7). Un altre estudi realitzat a Espanya per determinar la prevalença de la MPOC és l'estudi EPISCAN, que es va dur a terme en 3.802 individus en un rang d'edat d'entre els 40 i 80 anys; es va observar una prevalença total de la MPOC del 10.2% i es va posar de manifest que només el 27% dels individus amb MPOC estaven prèviament diagnosticats com a tals (8,9).

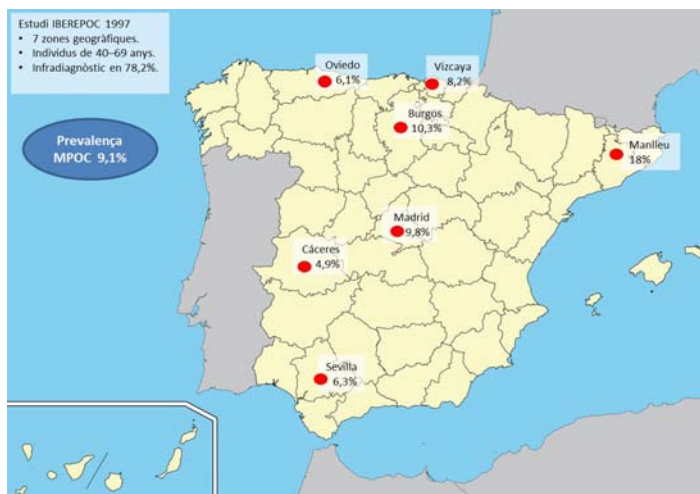
A més a més, la MPOC suposa una elevada càrrega econòmica com a conseqüència de les despeses directes i indirectes relacionades amb la malaltia. En particular les exacerbacions i hospitalitzacions d'aquests pacients són el que constitueix la despesa sanitària directa més important (10-12). Cal destacar que els pacients que consumeixen més recursos sanitaris són aquells que tenen una marcada alteració de la funció pulmonar (és a dir, un FEV₁ inferior al 50%) (10).

Figura 1. Evolució de les principals causes de mort en les darreres dècades.

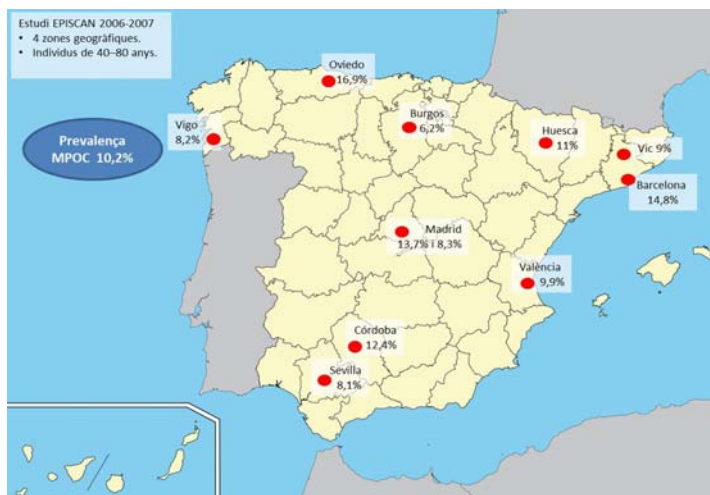


Adaptat de la GOLD *Global Strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD*.

Figura 2. Prevalença estimada de la MPOC a Espanya: estudis IBERPOC i EPISCAN.



Adaptat de Sobradillo et al. *Epidemiological study of COPD in Spain (IBERPOC)* (7).



Adaptat de Miravittles M, et al. *Prevalence of COPD in Spain* (9).

2.2. COLONITZACIÓ BACTERIANA EN LA MPOC

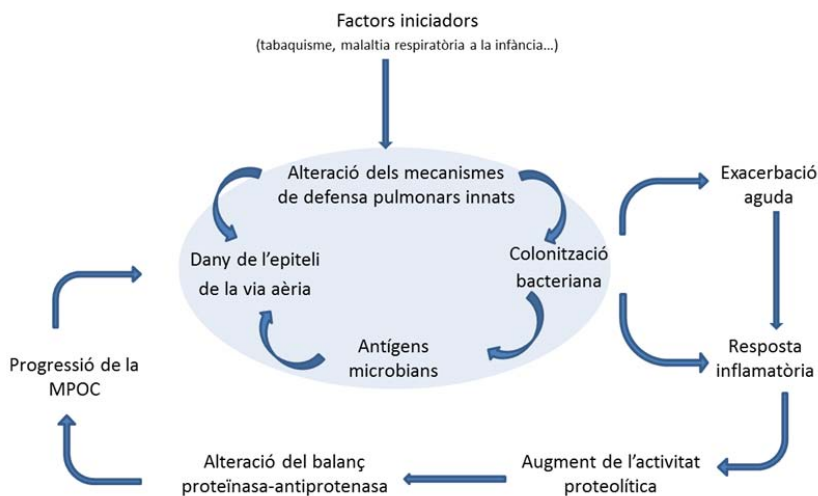
La via aèria distal és estèril en subjectes sans, però s'ha evidenciat que entre el 30-50% dels pacients amb MPOC greu en fase d'estabilitat clínica presenten bactèries potencialment patògenes (BPP) a la via aèria (13-15).

La presència de microorganismes a la mucosa bronquial sense provocar clínica infecciosa, es coneix com a colonització bronquial, que es diferencia de la infecció bronquial perquè en aquesta la presència microbiana condiona l'aparició de símptomes clínics (13).

Aquesta presència de bactèries a la via aèria dels pacients amb MPOC, malgrat no ocasiona manifestacions clíniques, s'ha evidenciat que causa una major concentració de cèl·lules i citocines pro-inflamatòries (14-20), fet que accelera la pèrdua de la funció pulmonar (21) i s'associa amb una major freqüència i gravetat de les aguditzacions de la MPOC (22), que és un dels principals factors de mal pronòstic de la malaltia (23,24), i comporta una major resposta inflamatòria local (figura 3).

En un estudi longitudinal d'una gran cohort de 2.138 pacients amb MPOC es van analitzar les aguditzacions d'aquests (21). Es va evidenciar que les aguditzacions eren més freqüents i greus en aquells pacients amb MPOC més greu, i per altra banda que hi havia una major susceptibilitat a les aguditzacions quan el pacient havia presentat història d'aguditzacions prèvies en el darrer any. Els autors plantejaven una possible associació de la susceptibilitat a les aguditzacions amb algun factor intrínsec i a una possible major inflamació de la via aèria en fase estable d'aquests subgrup de pacients.

Figura 3. Hipòtesi del cercle-viciós infecció-inflamació en la MPOC.



Adaptat de Sethi S, *et al. Infection in the Pathogenesis and Course of COPD* (22).

2.2.1. Colonització bacteriana i inflamació

Diferents estudis han descrit l'augment de la inflamació a la via aèria de pacients amb colonització bacteriana (taula 1). Soler *et al.* (14) van estudiar el perfil d'inflamació en els RBA de subjectes controls, fumadors i pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica (n= 8, 18 i 52 pacients, respectivament) i es van determinar en RBA els nivells de interleucines (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10), i del factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α). Van detectar que el FEV₁ es correlacionava inversament amb el percentatge de neutròfils i amb les concentracions de IL-6 i IL-8 en el RBA; l'índex paquet-any, la IL-8 i el TNF- α es correlacionaren amb el percentatge de neutròfils en el RBA, i que la presència de BPP s'associava de manera significativa amb major percentatge de neutròfils i major concentració de TNF- α en el RBA.

En un estudi per determinar la inflamació bronquial en pacients amb bronquitis, Riise GC. *et al.* (15) van incloure 43 pacients amb bronquitis crònica (23 sense obstrucció al flux aeri i 19 amb obstrucció) i 13 controls sans. Es va realitzar RP

per estudi microbiològic i RBA. En el grup de pacients amb bronquitis crònica es va detectar major elevació dels nivells de mieloperoxidasa (MPO), IL-8, àcid hialurònic i proteïna catiònica dels eosinòfils (*eosinophil cationic protein, ECP*), respecte al grup de subjectes sans. En el grup dels individus amb bronquitis crònica en el qual es va aïllar *Streptococcus pneumoniae* els nivells de MPO, IL-8 i ECP eren els més alts comparativament amb la resta de grups. Bresser P. *et al.* (16) van detectar mitjançant l'anàlisi de l'esput que la inflamació local de la via aèria era diferent entre el grup de pacients infectats per *H.influenzae* amb bronquitis crònica sense obstrucció al flux aeri respecte aquells infectats i amb obstrucció. La comparació amb el grup de pacients MPOC no infectats suggeriria que la inflamació de les vies respiratòries és més pronunciada en pacients amb MPOC crònicament infectats.

Per altra banda, Hill *et al.* (17) a l'estudiar 160 pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica (n=55 pacients amb MPOC i n= 62 pacients amb MPOC i dèficit d'alfa-1-antitripsina greu) van observar una correlació entre la càrrega bacteriana de la via aèria i els nivells de mieloperoxidasa en l'esput (una mesura indirecta de l'activació i nombre dels neutròfils), els nivells de IL-8 i de leucotriè B4, l'activitat de l'elastasa leucocitària de l'esput (*sputum leukocyte elastase activity*) i el filtrat d'albumina del sèrum a l'esput. I van detectar que els marcadors d'inflamació augmentaven progressivament amb l'augment de la càrrega bacteriana. Finalment Sethi S. *et al.* (18), en un estudi recent, van estudiar mitjançant RBA a pacients ex-fumadors amb MPOC en fase estable (n=26), ex-fumadors sense MPOC (n=20) i sans no fumadors (n=15) per determinar el nivell d'inflamació bronquial i la colonització bacteriana. Aquells subjectes amb MPOC colonitzats van presentar majors nivells relatius i absoluts en RBA de neutròfils, IL-8, *active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)* i endotoxina, respecte els subjectes no colonitzats amb MPOC i també quan es comparaven aquests paràmetres inflamatoris amb el grup d'ex-fumadors i el de no fumadors.

2.2.2. Colonització bacteriana i l'impacte en la malaltia

Addicionalment, està descrit que la colonització bacteriana produeix un efecte negatiu en el curs de la MPOC. Wilkinson *et al.* (19) van estudiar la inflamació i la càrrega bacteriana en pacients amb MPOC moderats-greus i la seva relació amb el descens de la funció pulmonar durant 12 mesos de seguiment. Es van incloure 30 pacients i es va detectar que el descens de FEV₁ es correlacionava amb una major càrrega bacteriana en l'esput i que fou major en els subjectes que presentaven canvis en les bactèries que colonitzaven la via aèria respecte aquells que només presentaven un tipus bacterià durant el seguiment. En un altre estudi de Patel *et al.* (20) van estudiar en 29 pacients amb MPOC la relació entre la presència de bactèries a la via aèria d'aquests pacients en fase clínica estable i la freqüència i gravetat de les seves aguditzacions. Es va detectar que aquells pacients amb colonització bacteriana de la via aèria (concretament aquells amb *Haemophilus influenzae*) presentaven més símptomes i una major freqüència d'exacerbacions durant el període de seguiment, així com una elevació de IL-8 en l'esput que es correlacionava directament amb la càrrega bacteriana. Uns altres autors (23) van estudiar la inflamació i les exacerbacions en un total de 57 pacients amb MPOC moderat i greu. Es va determinar que els pacients amb 3 o més exacerbacions per any presentaven major nivells de IL-6 i IL-8 en l'esput en fase d'estabilitat clínica que aquells amb menor número d'exacerbacions.

Taula 1. Estudis sobre colonització i inflamació bronquial en la MPOC.

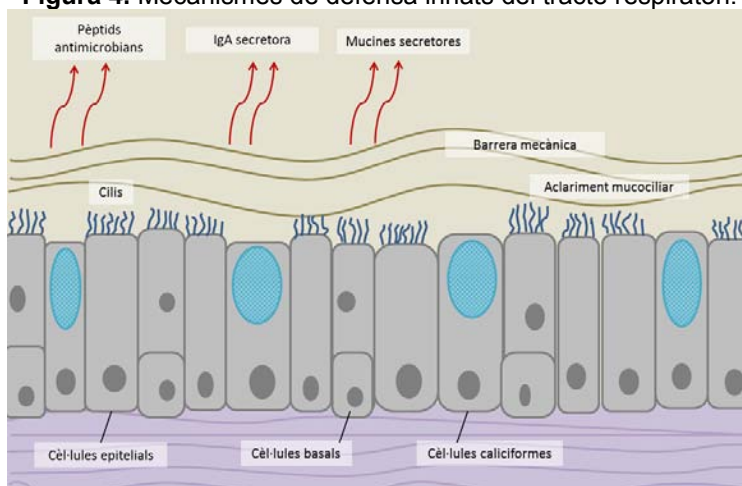
Autor	Any	Subjectes (n)	Paràmetres inflamatoris	Troballes	Impacte
Riise GC. et al.	1995	Bronquitis crònica: -sense obstrucció al flux aeri (n= 23) -amb obstrucció (n=19) -controls sans (n=13)	En RBA: MPO, IL-8, àc. hialurònic, proteïna catiònica eosinofílica. En RP: BPP.	-↑MPO, IL-8, àc. hialurònic, ECP en grup amb bronquitis respecte els sans. -↑ MPO, IL-8 i ECP en subjectes bronquitis + <i>S.pneumoniae</i>	
Soler N. et al.	1999	Controls (n=8) Fumadors (n=12) MPOC (n=52)	En RBA: IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, neutròfils(%)	-Correlació inversa menor FEV ₁ amb ↑ neutròfils, IL-6, IL-8. - BPP correlació amb ↑%neutròfils i ↑TNF-α	
Bresser P. et al.	2000	Bronquitis crònica estable + infecció crònica <i>H. influenzae</i> : - amb obstrucció flux aeri (n=10) -sense obstrucció (n=10)	En esput: MPO, TNF-alfa, <i>plasma protein leakage</i> , IL-8, IgA secretora i lactoferrina Cultiu d'esput: <i>H. influenzae</i>	-↑ MPO, TNF-α, <i>plasma protein leakage</i> en el grup amb obstrucció flux aeri -IL-8, IgA secretora i lactoferrina similars en 2 grups.	
Hill A T. et al.	2000	MPOC (n=55) MPOC DA1AT (n=62) Bronquièctasis (n=43)	MPO, IL-8, LTB4, activitat d'elastasa leucocitària	-Correlació directa a major càrrega bacteriana: ↑ MPO, IL-8, LTB4 i activitat d'elastasa leucocitària.	
Bohmik A. et al.	2000	MPOC moderat/greu (n=57)	En esput: IL-6, IL-8. Exacerbacions darrer any.		-↑IL-8, IL-6 (fase estable) en pacients ≥3 exacerbacions/any.
Patel IS. et al.	2002	MPOC (n=29)	En esput: citocines, cultiu quantitatiu. Exacerbacions.	- ↑IL-8 relació directa amb càrrega bacteriana	-Major nombre d'exacerbacions en colonitzats.
Wilkinson TM. et al.	2003	MPOC (n=30)	En esput: IL-8, càrrega i tipus bacterià.		-Correlació entre major descens FEV ₁ amb major càrrega bacteriana
Sethi S. et al.	2006	MPOC (n=26) Ex-fumadors no-MPOC (n=20) Sans (n=15)	En RBA: IL-1, TNF, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, LTB4, MMP-9, TIMP-1, NE-A1AT	-MPOC colonitzats tenien ↑ neutròfils, IL-8, MMP-9, endotoxina	

DA1AT: dèficit d'alfa-1-antitripsina; MPO: mieloperoxidasa; BPP: bacteries potencialment patògenes; TNF: *Tumor necrosis factor*; IL: interleucina; IgA: immunoglobulina A; LTB4: Leucotriè B4; MMP-9: *matrix metalloproteinase-9*; TIMP-1: *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1*; NE-A1AT: *neutrophil elastase/anti-neutrophil elastase complex*; ECP: *eosinophil cationic protein*.

2.3. ELS MECANISMES DE DEFENSA PULMONAR I LA COLONITZACIÓ BRONQUIAL

És ben conegut que la defensa del pulmó davant dels agents externs inclou una àmplia varietat de mecanismes que tenen la finalitat d'eliminar de la via aèria diferents partícules inhalades i microorganismes, que són els mecanismes de defensa pulmonar. Els mecanismes de protecció de la via aèria, compostos per les diferents estructures anatòmiques, la tos i el sistema muco-ciliar, constitueixen la primera barrera davant dels agents potencialment nocius. La immunitat, tant innata com adaptativa, juga un paper essencial en el reconeixement i la lluita contra els agents externs, principalment d'origen infecciosos. Diferents factors humerals i cel·lulars realitzen una funció crucial per evitar la presència d'infeccions respiratòries, tant agudes com cròniques. Entre aquests cal destacar algunes proteïnes del moc: les mucines o els pèptids antimicrobians, les proteïnes transmembrana capaces de detectar diferents patrons moleculars: els Toll - like receptors, les cèl·lules amb capacitat fagocítica o citocida i les immunoglobulines específiques creades per mantenir una memòria immunològica. Tots aquests actuen tant de manera individual com conjunta per mantenir el pulmó sa i estèril (figura 4, taula 2).

Figura 4. Mecanismes de defensa innats del tracte respiratori.



Adaptat de Sethi S, et al. *Infection in the Pathogenesis and Course of COPD* (22).

Taula 2. Factors humorals de l'immunitat innata.

Molècules amb activitat bactericida/ antiviral:	
Mucines	
Mucines secretades	MUC5AC, MUC5B MUC2, MUC8 i MUC19
Mucines associades a membrana	MUC1, MUC4, MUC11, MUC13, MUC15, MUC20
Pèptids antimicrobians de la via aèria	
	α -defensines: HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4, HNP-5, HNP-6
Defensines	β -defensines: hBD-1, hBD-2 θ -defensines
Catelicidines	hCAP-18, LL-37
Histatines	.
Lactoferrina	
Lizosima	
Complement	
Muramidasa	
Interferons	
Molècules que faciliten el reconeixement i fagocitosi:	
Col·lectines	
Proteïnes de fase aguda	
Factors del complement	
Proteïna d'unió de lipopolisacàrids (LPS-BP)	

Adaptat de Garcia-Bellmunt L, Sibila O. *Mecanismos de defensa pulmonar* (25).

Malgrat que l'impacte de la colonització bacteriana en la MPOC és de gran importància, actualment es desconeixen les causes per les quals alguns pacients amb MPOC presenten colonització per BPP a la seva via aèria i d'altres no.

En la literatura científica hi ha pocs estudis en relació als mecanismes pels quals alguns pacients amb MPOC tenen major predisposició a estar colonitzats que d'altres. Monsó *et al.* (24) van estudiar els factors de risc per la colonització bacteriana en pacients amb bronquitis crònica en fase estable. En aquest estudi es van incloure 41 pacients i mitjançant el cultiu de raspallat protegit (RP) es va determinar la presència de BPP. Es va observar que el 22% dels pacients presentaven BPP a la via aèria i que els factors que s'associaven amb la colonització eren el tabaquisme actiu i, en menor mesura, tenir una capacitat vital forçada (FVC) baixa. En un altre estudi, Zalacain *et al.* (26) van incloure 88 pacients amb MPOC i es va determinar mitjançant el cultiu del RP la presència de bactèries a la via aèria. Un 30,7% dels pacients presentaven cultius positius per BPP, fet que s'associava amb el tabaquisme actiu.

Per altra banda, recents estudis han detectat l'alteració d'algunes proteïnes que formen part de sistema de defensa pulmonar, com són les mucines i els pèptids antimicrobians en algunes patologies respiratòries, principalment la fibrosi quística, l'asma i la MPOC (27,28). Tot i això, no hi ha estudis que valorin la situació d'aquests mecanismes de defensa en aquells pacients amb MPOC i BPP a la via aèria i es desconeix en quina forma aquests mecanismes podrien estar alterats en aquells pacients amb MPOC colonitzats. Així doncs, malgrat que s'han descrit alguns factors relacionats amb la colonització bacteriana en la MPOC i estar àmpliament descrits els sistemes de defensa pulmonar, en l'actualitat no es coneixen els mecanismes directament implicats en la colonització bacteriana en els pacients amb MPOC. En aquesta tesi es planteja la possible implicació d'alguns dels mencionats mecanismes de defensa, i es postula que alguns d'aquests factors estiguin alterats i predisposin a la colonització de la via aèria dels pacients amb MPOC.

2.3.1. Les mucines

Les mucines són glicoproteïnes que constitueixen el principal component del moc. Les principals mucines que es secreten a la via aèria i que ajuden a conferir les propietats viscoelàstiques del moc són amb una major proporció la MUC5AC i la MUC5B, i en menor proporció la mucina MUC2 (29, 30).

Prèviament s'ha estudiat la presència i alteració de les mucines secretades en algunes patologies respiratòries, com és el cas de la fibrosi quística, l'asma i la MPOC. Henke *et al.* (31) van estudiar els nivells de MUC 5AC i MUC B en l'esput de pacients amb fibrosi quística (FQ) (n=15) i en subjectes control (n=11) i van observar que els nivells relatius d'aquestes mucines secretades estaven més baixos en l'esput dels subjectes amb fibrosi quística. El mateix grup va estudiar el nivell de mucines en la FQ en fase d'estabilitat clínica i d'agudització en un grup de 11 pacients amb FQ i en 12 subjectes sans detectant que els nivells de les MUC 5AC i 5B estaven disminuïts durant la fase d'estabilitat de la malaltia però s'incrementaven durant les exacerbacions pulmonars, sense arribar però a superar els nivells de la via aèria normal no inflamada (32).

Altres treballs en subjectes amb MPOC i asma han detectat alteració dels nivells de mucines en la via aèria, concretament majors nivells en esput de MUC 5AC i MUC 5B, i en molt menor grau de MUC 2 (33-35). En un projecte dut a terme per Kirham *et al.* es va detectar que en l'esput dels pacients amb MPOC i FQ hi havia un augment en la quantitat relativa de MUC 5B en major grau que de MUC5AC; i que el tipus de MUC 5B detectat en l'esput de subjectes sans era diferent respecte el dels asmàtics (35). En un altre estudi realitzat l'any 2008 es van comparar pacients amb MPOC (n=15) i fumadors sense obstrucció al flux aeri (n=17), i es va detectar que la MUC 5AC era la mucina predominant en els pacients fumadors sense obstrucció mentre que MUC 5B era més abundant en pacients amb MPOC i es correlacionava amb valors més baixos de FEV₁ (33), tot i que no van poder establir una relació en aquestes troballes i la implicació amb la fisiopatologia de la malaltia. Per altra banda, uns altres autors van detectar que la MUC5AC estava incrementada en les cèl·lules de les glàndules submucoses bronquials dels pacients amb MPOC fumadors (n= 18), comparativament amb els

pacients fumadors sense obstrucció al flux aeri (n= 16) i els no fumadors (n= 9) (34). Així doncs es posa de manifest que l'expressió de les mucines secretores no és igual en les diferents malalties respiratòries cròniques.

Finalment en una recent publicació, en un model animal Roy *et al.* posen de manifest que els ratolins modificats genèticament que no expressen mucina MUC5B presenten un major risc d'infecció, tant de via aèria superior com inferior, i mort per aquesta causa respecte els ratolins amb expressió correcta de mucina. No es van detectar alteracions rellevants pel que fa a ratolins modificats que no expressen MUC 5AC. Els autors d'aquest estudi conclouen que malgrat s'han de dur a terme més estudis la MUC 5B sembla ser necessària per la defensa de la via aèria (36).

Taula 3. Alteració del nivell de mucines secretores en diferents patologies respiratòries.

Autor	any	Subjectes (n)	paràmetres inflamatoris
Fibrosi quística (FQ)			
Henke MO. <i>et al.</i>	2004	FQ (15) controls (11)	↓ MUC5AC i MUC5B en les secrecions respiratòries de FQ
Henke MO. <i>et al.</i>	2007	FQ (11) controls (12)	↑ MUC5AC i MUC5B en exacerbacions pulmonars de la FQ.
Asma i MPOC			
Kirham S. <i>et al.</i>	2002	Controls (15) Asma (6)	↑ MUC 5AC i ↑ MUC 5B en asmàtics respecte controls sans
Kirham S. <i>et al.</i>	2008	MPOC (15) Fumadors no MPOC (17)	↓ MUC 5AC i ↑ MUC 5B en moc respecte fumadors amb funció pulmonar normal.
Caramori G. <i>et al.</i>	2009	Controls (10) Fumadors no MPOC (20) MPOC (20)	↑ cèl·lules MUC 5AC + en glàndules submucoses de MPOC respecte fumadors amb funció pulmonar normal i no-fumadors. No diferències en MUC 5B.

2.3.2. Els pèptids antimicrobians

Els pèptids antimicrobians són proteïnes catiòniques biològicament actives, efectores del sistema immune innat del pulmó, necessàries per la protecció de la via aèria davant les bacteries i els virus (37, 38). Són secretades pels macròfags i les cèl·lules epitelials. La seva secreció ve estimulada per diferents productes microbians (39) i la inflamació sembla jugar un paper important en la seva regulació (40). Les principals famílies de PAM expressades en el tracte respiratori són les defensines i les catelicidines.

A part de la seva funció antimicrobiana tenen altres funcions, com són la regulació de la inflamació, de la immunitat i la reparació del dany (41). En relació amb la capacitat per modular el dany pulmonar el grup d'Anderson *et al.*, van estudiar en 44 pacients trasplantats pulmonars (30 sense patologia i 14 amb bronquiolitis obliterant [BO]). Van determinar els nivells de PAMs a la via aèria (catelicidines: hCAP-18LL-37, α -defensines: *human neutrophil peptides* [HNP]1-3, b-defensines: hBD-2, elafin, *secretory leukoprotease inhibitor* [SLPI]) i van realitzar l'estudi microbiològic del RBA. En aquells pacients trasplantats que presentaven la síndrome de BO es va observar que tot i l'absència de patògens en la via aèria, presentaven una elevació de catelicidina (hCAP) 18/LL-37 i de HNP 1-3 en RBA (42). Així doncs es va posar de manifest que la resposta dels PAM podria contribuir a generar un ambient pro-inflamatori, promoure el dany tissular i una resposta reparadora excessiva que pogués induir la remodelació característica de la síndrome de la BO.

Es coneix que el tabac pot influir en la secreció dels PAMs a la via aèria, així en un estudi realitzat per Herr *et al.* (43) es van recollir mostres de rentats faringis i esputs de subjectes amb pneumònia adquirida a la comunitat i es va determinar el nivell de la beta-defensina-2 (hBD-2). El fet de ser fumador actiu o ex-fumador es va associar amb la detecció de nivells significativament disminuïts de hBD-2 en les mostres respiratòries dels pacients amb pneumònia. En el mateix estudi es va valorar l'exposició de l'epiteli de la via respiratòria al fum del tabac *in vitro* i es va observar la inhibició de la inducció de hBD-2 per part de les bacteries. En definitiva van detectar que el fum del tabac suprimeix la inducció de les defenses

antibacterianes a nivell epitelial. Els nivells de PAM a la via aèria semblen jugar un paper important en la infecció, no obstant això, no es coneix la seva implicació exacta en la colonització de la via aèria en la MPOC. En un estudi realitzat amb 11 pacient amb MPOC, es van recollir mostres d'esput en fase estable, de colonització i d'agudització, i es van analitzar diferents paràmetres: PAM, lisozima, lactoferrina, IL-37 i *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI). Es va detectar que l'adquisició de soques d'*Haemophilus influenzae* i *M. catarrhalis* en pacients amb MPOC estables (colonitzats) i aguditzats s'associà a canvis significatius en els nivells de pèptids antimicrobians en la via aèria (44).

Malgrat es coneix que l'alteració de la immunitat innata pot contribuir en la colonització bacteriana i la infecció de la via aèria de pacient amb MPOC, hi ha poca informació sobre els nivells de mucines i pèptids antimicrobians en aquests pacients, i com els canvis en els nivells d'aquestes proteïnes poden influir en la colonització bacteriana. La hipòtesi que es va plantejar en aquesta tesi va ser que els pacients amb MPOC estable amb BPP presentaven nivells alterats, d'aquestes proteïnes en la via aèria comparat amb aquells sense BPP i que aquest podia ser un dels mecanismes implicats en la presència de bactèries a la via aèria.

2.4. MÈTODES DIAGNÒSTICS EN LA COLONITZACIÓ BRONQUIAL EN LA MPOC: UTILITAT DE LA TACAR I D'UN NAS ELECTRÒNIC

La colonització bacteriana en la MPOC, ha estat àmpliament descrit en la literatura com a factor que influeix negativament en el curs clínic de la malaltia, que augmenta la inflamació local i la freqüència i gravetat de les aguditzacions i per tant augmenta la morbi-mortalitat d'aquests pacients (14-21,23). L'antibioteràpia administrada de forma intermitent o crònica s'ha descrit en estudis previs que prevé les exacerbacions i hospitalitzacions, probablement perquè assoleix el descens de la càrrega bacteriana i la inflamació de la via aèria de pacients en fase d'estabilitat clínica. Així doncs la identificació adequada d'aquells pacients colonitzats mitjançant eines no invasives és de gran importància ja que podria generar una intervenció precoç en aquell grup de pacients colonitzats, tot i que són necessaris estudis que corroborin el benefici del tractament en aquest perfil de pacients (45).

El mètode de referència per establir la presència de colonització bacteriana és el cultiu de mostres endobronquials estèrils (46,47), però a la pràctica clínica diària s'utilitza un mètode diagnòstic no invasiu, que és el cultiu de l'esput. Aquest presenta importants limitacions com són: la dificultat per l'obtenció de la mostra, i que aquesta sigui de qualitat (definit per la presència de <10 cèl·lules epitelials i >25 leucòcits per camp), fet que es dona només en un 40-70% (46,48). Per aquest motiu es planteja que nous mètodes diagnòstics no invasius són necessaris i haurien de ser validats per poder optimitzar la detecció d'aquests pacients amb BPP i així poder-ne fer una intervenció precoç.

2.4.1. La TAC d'alta resolució

El TACAR és una exploració complementària d'elecció per l'estudi de moltes patologies del parènquima pulmonar, concretament és de gran utilitat en l'estudi de malalties parenquimatoses difuses (intersticials, alveolars i de la petita via aèria); genera una imatge bidimensional d'una secció axial tridimensional amb un

gruix de tall de 1-2mm, que permet una major sensibilitat que la tomografia computeritzada (TC) convencional en l'estudi de dites patologies (49,50).

La seva utilitat en les infeccions respiratòries es centra en el camp de les infeccions en pacients immunodeprimits (51) i en les infeccions víriques (52) (taula 4). Així en el camp de la infecció, l'ús del TACAR està àmpliament estès a la pràctica clínica habitual, sobretot pel diagnòstic de les infeccions oportunistes en els hostes immunodeprimits. En estudis recents s'han valorat noves possibles aplicacions del TACAR en el diagnòstic precoç d'anomalies pulmonars en pacients amb neutropènia (53) i la seva possible utilitat per diferenciar el síndrome alo-immune respecte complicacions pulmonars en pacients amb trasplantament de cèl·lules hematopoètiques (54,54,55), entre d'altres.

L'altre grup d'infeccions respiratòries per a les quals el TACAR és de gran utilitat són les infeccions pulmonars víriques, tant en subjectes amb immunosupressió com en immunocompetents. En aquest grup d'infeccions les troballes per TC descrites més freqüentment han estat: la consolidació, les opacitats en vidre esmerilat, l'engruiximent septal interlobulillar, els nòduls centrelobulillers, l'engruiximent de parets bronquials i l'atrapament aeri/ perfusió "en mosaic" (56,57). Recentment hi ha hagut un creixent interès en l'estudi de les troballes per TACAR de la infecció vírica, a arrel del pandèmia del virus de la grip H1N1; en els treballs publicats es van detectar uns patrons radiològics més freqüentment associats a dita infecció però malgrat això no es van poder definir unes troballes radiològiques específiques (58,59). Per altra banda, s'ha estudiat la potencial aplicació de la TACAR per diferenciar segons el patró radiològic la infecció per citomegalovirus (CMV) respecte per *Pneumocystis jirovecii* (PJ), però sense èxit (60).

Taula 4. Troballes en la TACAR en les infeccions pulmonars.

Troballes TACAR	Infeccions víriques	Infeccions oportunistes: Pneumocystis	Infecció bronquial	Infeccions fúngiques: HBPA
Nòduls	x	xx	x	Centrilobulillers: xx
Vidre esmerilat	xx	xx		
Consolidació	xx	xx Perihiliars, camps mitjos/ inferiors		x
<i>Tree in bud</i>			xx	xx
Engruiximents de parets bronquials	x	x	xx	x
Atenuació "en mosaic"	x			x
Impactes mucosos			xx	xx (d'alta atenuació)
Bronquièctasis				Centrals: xx

La TACAR ha estat aplicada també en el camp de les malalties pulmonars obstructives (taula 5). Uns autors van valorar el gruix de la paret bronquial mitjançant la TACAR en subjectes amb MPOC i en subjectes amb asma, detectant que en els asmàtics es correlacionava un major gruix de la paret bronquial i un menor diàmetre de la llum de la via aèria amb una major gravetat de la malaltia pulmonar, mentre que no era així en subjectes amb MPOC (61).

En un altre estudi realitzat en 54 pacients amb MPOC, en el qual es va realitzar TACAR per determinar la presència de bronquièctasi i valorar la seva correlació amb la història prèvia d'exacerbacions i la inflamació. En 27 dels 54 pacients van detectar la presència de bronquièctasis i en aquest grup de pacients es van detectar majors nivells de citocines inflamatòries a la via aèria, major colonització bacteriana, majors nivells de IL-8 i IL-6 en esput i major temps de recuperació en les exacerbacions. Per altra banda no es van detectar diferències en les troballes de la TACAR i la freqüència de les exacerbacions (62).

Arrel de la publicació de les noves guies de maneig de la MPOC i la definició dels diferents perfils d'aquests pacients, diversos estudis han valorat la possible aplicació del TACAR en detectar trets radiològics que poguessin ésser característics en cadascun dels grups de pacients amb MPOC. Així el grup de Kitaguchi *et al.* van valorar les característiques clíniques dels pacients amb MPOC segons la classificació en fenotips basada en les troballes radiològiques. Van incloure un total de 85 pacients amb MPOC en fase estable, que van clasificar en 3 fenotips: fenotip E, emfisema sol (n=30); fenotip M, combinació d'emfisema i engruiximent de la paret bronquial (n= 31) i fenotip A, escassa quantitat d'emfisema amb i sense engruiximent de la paret bronquial (n=24). Van detectar que en el fenotip A hi havia major prevalença d'individus no fumadors i amb clínica de sibilants, major índex de massa corporal (IMC) i capacitat de difusió de monòxid de carboni (DLCO) i major reversibilitat amb fàrmacs beta-agonistes. A major grau d'emfisema van detectar una menor DLCO i menor relació FEV1/FVC. En els fenotips A i M l'engruiximent de la paret bronquial es correlacionava amb una major resposta al tractament amb beta-agonistes de llarga durada (LABA) i beta-agonistes de curta durada (SABA) i corticosteroides inhalats (CI) així com amb una major eosinofília en esput. Per tant es van determinar diferents característiques clíniques segons la classificació per TACAR i que podien tenir implicació pel que faria a la resposta de tractament d'aquests pacients (63).

En la mateixa direcció un altre grup va valorar la relació entre el fenotip detectat mitjançant la TACAR i la clínica, l'estat de salut, la freqüència de les exacerbacions i la gravetat de la malaltia. Van incloure 156 pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica van realitzar TACAR i van recollir dades i qüestionaris de salut, detectant que el percentatge d'emfisema per TACAR es correlacionava amb menor FEV1 i major puntuació de l'índex BODE (*Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity*); que el percentatge d'emfisema i el gruix de la paret bronquial es correlacionen amb l'estat de salut i que el gruix de la paret bronquial (i no l'emfisema) s'associava amb una major freqüència d'exacerbacions en els pacients que havien experimentat una exacerbació durant l'any previ (64).

Finalment uns altres autors van estudiar l'ús de la TACAR en la caracterització en fenotips de la MPOC, per fer-ho van proposar l'ús del sistema de puntuació de Bhalla modificat. Van incloure un total de 80 pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica i van catalogar segons les troballes de la TACAR i la puntuació de Bhalla modificada 3 grups: només emfisema (E), només bronquièctasis/engruiximent de la paret bronquial i emfisema (E+B/PBT) + bronquièctasis/engruiximent paret bronquial (B/PBT). Van detectar diferències estadísticament significatives quan comparaven el grup d'E i E+B/PBT respecte B/PBT mostrant pitjors valors de les proves de funció pulmonar, major proteïna C reactiva (PCR) i major número d'exacerbacions (65).

Així doncs, tot i que està ben establert que la TACAR és útil en el diagnòstic i valoració de certes infeccions pulmonars i que presenta una potencial aplicació per valorar els diferents fenotips de la MPOC, no es coneix la seva aplicació en el camp de la colonització bronquial en els pacients amb MPOC. Per aquest motiu en l'actual tesi es pretén investigar la utilitat del TACAR com a mètode diagnòstic no invasiu de la colonització bacteriana en la MPOC i valorar en un segon lloc quins patrons radiològics s'associen més freqüentment amb la presència de colonització bacteriana.

Taula 5. Troballes en la TACAR en l'estudi dels pacients amb MPOC.

Autor	Any	Subjectes de l'estudi	Troballes
Kosciuch J. <i>et al.</i>	2013	Asma (n=10) MPOC (n=12)	Engruïment de paret bronquial i disminució llum via aèria correlació amb gravetat de l'asma (no en MPOC)
Patel IS. <i>et al.</i>	2004	MPOC estables (n=54): -no bronquièctasi (n=27) -bronquièctasi (n=27)	↑ nivells IL-8 i IL-6 en esput ↑ colonització de la via aèria ↑ temps recuperació de les exacerbacions
Kitaguchi Y. <i>et al.</i>	2006	MPOC estables (n=85): -fenotip E (n= 30) -fenotip M (n=31) -fenotip A (n=24)	-Fenotip A ↑ prevalença de no fumadors, sibilàncies, >IMC, >DLCO, > reversibilitat a B-agonistes. -Grau d'emfisema s'associa a: <DLCO, <FEV1/FVC. -En fenotip A i M s'associa l'engruïment de la PB amb >resposta al tractament BD i CI, ↑ eosinofília en esput.
Han MK. <i>et al.</i>	2009	MPOC estables (n=156)	-% emfisema correlacionava amb <FEV1 i >BODE -% emfisema i gruix de PB es correlacionen amb: estat de salut -gruix de PB s'associa amb >freqüència d'exacerbacions.
Tulek B. <i>et al.</i>	2013	MPOC estable (n=80): -grup E (n=27) -grup E+B/PBT (n=20) -grup B/PBT (n=7)	Grup E i E+B/PBT respecte grup B/PBT: <PFR, >PCR, > nombre d'exacerbacions

IL: interleucina; IMC: índex de massa corporal; DLCO: capacitat de difusió de CO; BD: broncodilatador; CI: corticosteroides inhalats; BODE: *Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity*; PB: paret bronquial; E: emfisema, B/PBT: bronquièctasi/engruïment de la paret bronquial; PFR: proves funcionals respiratòries; PCR: proteïna C reactiva.

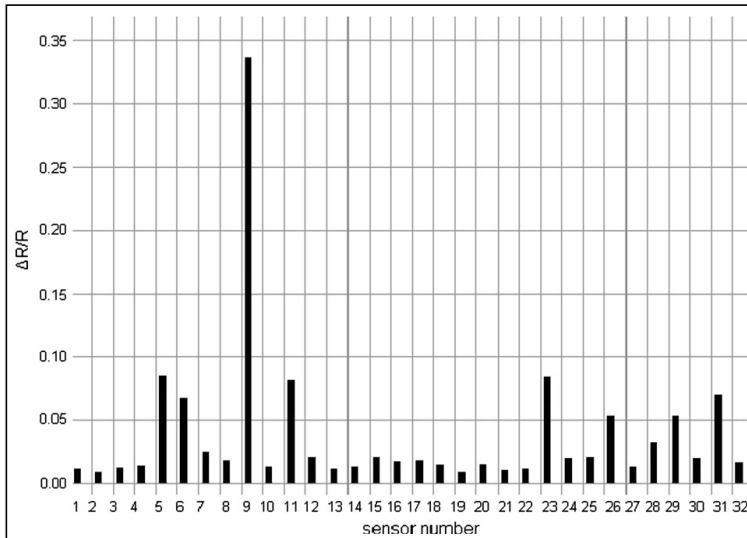
2.4.2. El nas electrònic

El nas electrònic (*e-nose*) és una tecnologia no invasiva emergent que detecta els compostos orgànics volàtils (COVs) en el gas exhalat. Concretament l'aparell Cyranose 320 ® (Smithprotection, Pasadena, CA), és el primer nas electrònic realitzat amb 32 nano-sensors que experimenten canvis específics en la seva resistència elèctrica al ser exposats a les partícules volàtils de l'aire (figura 5). Com a resultat aquests generen un patró de COVs o “empremta olfactiva” característic per a cada olor i que està constituït per 32 punts diferents obtinguts dels resultats que ofereix cada nano-sensor (figura 6). El sistema per la recollida de l'aire exhalat, consta de diferents parts: una vàlvula de Hans-Rudolph amb un filtre inspiratori NBQ, capaç d'eliminar compostos químics de l'aire atmosfèric, i un reservori expiratori de sílice que permet secar l'aire i elimina la humitat i finalment una bossa de Tedlar on es recull l'aire que posteriorment serà exposat al nas electrònic (figura 7) (66).

Figura 5. Nas electrònic Cyranose 320.

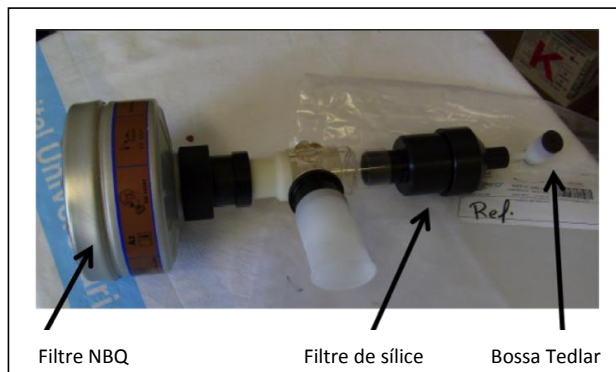


Figura 6. Patró de COVs.



Patró de COVs o "smell print" obtingut a partir de la utilització de Cyranose 320®, en el que poden observar-se els 32 punts obtinguts, un per cada nano-sensor.

Figura 7. Dispositiu de recollida de l'aire exhalat.



Consta de diverses parts: un filtre NBQ (que elimina compostos químics de l'ambient), un filtre de sílice (que elimina la humitat) i la bossa de Tedlar on es recull l'aire exhalat després d'una inspiració i espiració màximes.

El gas exhalat conté una barreja complexa de compostos orgànics volàtils que es deriven de diverses vies metabòliques i inflamatòries en el pulmó (67-69). Així les empremtes olfactivores específiques d'algunes malalties respiratòries s'han utilitzat

amb èxit per a la detecció de càncer de pulmó, el mesotelioma pleural maligne, l'asma i la MPOC (66,70-74).

En càncer de pulmó, es va realitzar un estudi dels COVs en l'aire exhalat en 14 pacients amb càncer de pulmó broncogènic i 54 controls. Es va determinar que el patró de COVs generat pel nas electrònic permetia detectar els pacients amb càncer de pulmó amb una sensibilitat del 71% i una especificitat del 91% (66). En un treball realitzat per Dragonieri *et al.*, es van comparar els patrons de COVs en l'aire exhalat de 10 pacients amb càncer de pulmó de cèl·lula no petita, 10 controls sans i 10 pacients amb MPOC, i van trobar diferències entre els COVs dels tres grups (70). En mesotelioma els mateixos autors van realitzar un treball en el qual van comparar el patró de COVs detectat per e-nose en pacients amb mesotelioma (n=13), subjectes amb exposició a l'asbest sense mesotelioma (n=13) i controls sans. Es va realitzar un anàlisi discriminant lineal basat en l'anàlisi de components principals (PCA) i es van trobar diferències en els patrons d'empremta olfactiva dels individus amb mesotelioma, respecte aquells amb exposició a l'asbest sense mesotelioma (amb una precisió del 80,8%, sensibilitat del 92,3% i especificitat del 85,7%) i respecte aquells individus controls sans (amb una precisió del 84,6%) (71).

Pel que fa a l'asma el mateix grup, van realitzar un estudi en el qual van comparar 20 pacients amb asma, dels quals 10 eren moderats i 10 greus, amb 20 subjectes control. Es van trobar diferències entre els COVs dels pacients asmàtics moderats respecte els greus, així com quan es comparava respecte els controls sans (72). Utilitzant la mateixa metodologia del nas electrònic, un altre estudi va comparar l'aire exhalat de pacients asmàtics (n=20) i de pacients amb MPOC (n=30), subjectes controls fumadors (n=20) i no fumadors (n=20). No hi havia diferències pel que fa a les característiques biomètriques i en el grup d'asma i MPOC hi havia el mateix percentatge de pacients amb tractament amb corticoides inhalats, que es van suspendre abans de la recollida de l'aire exhalat. Com a resultats es va observar que hi havia diferències estadísticament significatives entre els COVs de tots els grups (73).

En un altre estudi realitzat en pacients amb MPOC, es van analitzar els patrons de COVs determinats pel nas electrònic en l'aire exhalat de 18 pacients amb MPOC i 10 controls sans. L'anàlisi amb el nas electrònic de l'aire exhalat va permetre reconèixer correctament a tots els pacients amb MPOC i a 8/10 controls, que representa una sensibilitat del 100% i especificitat del 92% en el diagnòstic de la malaltia. Els falsos positius (7%) es van donar en subjectes fumadors pel que els autors recomanaven valorar el tabaquisme actiu com a factor confusor (74).

Per altra banda, altres estudis han demostrat que l'e-nose també és capaç d'identificar agents patògens específics de la via respiratòria superior de cultius *in vitro*. Així en un estudi realitzat a partir de cultius *in vitro*, es van agafar mostres en les quals s'havien aïllat bacteris coneguts i mostres sense aïllament bacterià, es van vaporitzar i van ser exposades al nas electrònic. El patró de COVs resultant va permetre evidenciar que el nas electrònic era capaç de diferenciar entre les mostres control i les mostres amb bacteris, i també que podia detectar diferències entre diversos patògens de la via aèria superior incloent *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, i *Pseudomonas aeruginosa* (75). Uns altres autors, mitjançant el nas electrònic i un algoritme de reconeixement de patró, van comparar el gas exhalar a través del nas de pacients amb sinusitis i de subjectes controls. L'anàlisi del gas exhalat exposat al nas electrònic va permetre predir correctament el diagnòstic de sinusitis en el 72% de les mostres (76). En un altra estudi realitzat per Hanson *et al.* es van incloure pacients d'una unitat de crítics que estaven intubats i ventilats mecànicament, que presentaven pneumònia associada al ventilador. Es va recollir l'aire exhalat a través del port expiratori del ventilador i va ser analitzat mitjançant el nas electrònic. L'anàlisi de l'aire exhalat mitjançant el nas electrònic va presentar bona correlació amb la puntuació de l'escala de gravetat de la pneumònia (77).

Fins ara, però, cap estudi ha explorat la possible utilitat del nas electrònic per identificar la colonització de la via aèria de pacients amb MPOC clínicament estables, però es podria donar la situació que aquells pacients amb BPP a la via aèria presentessin un perfil de COVs diferent d'aquells sense colonització bacteriana, hipòtesi que s'ha plantejat en l'actual projecte de tesi.

3. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE LA TESI

3. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE LA TESI

3.1. JUSTIFICACIÓ GENERAL

Els pacients amb MPOC presenten una elevada morbi-mortalitat, sobretot aquells amb un major grau d'obstrucció al flux aeri i consegüentment generen una important despesa de recursos sanitaris i econòmica associada a la malaltia. Es coneix que un nombre no menyspreable de pacients en fase d'estabilitat clínica presenten BPP a la seva via aèria i que això comporta una major inflamació local, que accelera la pèrdua de funció pulmonar i s'associa amb una major freqüència i gravetat de les aguditzacions de la MPOC.

Els mecanismes pels quals alguns pacients són més susceptibles a presentar BPP i d'altres no, no són coneguts. Les mucines i els pèptids antimicrobians, constitueixen una part del sistema de defensa pulmonar i s'ha descrit prèviament que poden estar alterats en algunes patologies respiratòries.

El mètode diagnòstic "gold estàndard" d'aquesta colonització és l'obtenció de mostres endobronquials mitjançant endoscòpia per l'anàlisi microbiològic, que és una tècnica invasiva i per tant no és útil a la pràctica clínica habitual. L'alternativa és el cultiu microbiològic de l'esput que malgrat ésser més aplicable en l'activitat clínica diària presenta importants limitacions. Es postula que hi ha noves tècniques diagnòstiques que podrien detectar dita colonització i obrir noves opcions que permetessin detectar la presència de BPP a la via aèria de manera no invasiva, com és el cas de la TACAR o del nas electrònic.

3.2. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE L'ESTUDI 1

La secreció de mucines i PAMs a la via aèria està alterada en alguns pacients amb MPOC greu, fet que els fa més susceptibles a ser colonitzats per BPP.

3.2.1. Objectius primaris:

-Estudiar l'expressió de les mucines secretores: MUC 5AC, MUC 5B i MUC2 a la via aèria de pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica i valorar la seva relació amb la presència de BPP.

3.2.2. Objectius secundaris:

-Estudiar la relació de la resposta inflamatòria pulmonar (IL-6) amb l'expressió de les mucines secretores.

-Estudiar la relació de la càrrega bacteriana amb l'expressió de mucines.

-Estudiar la relació entre el FEV1 i el nivell de mucines secretores.

-Estudiar l'expressió de PAM: alfa-1-defensina a la via aèria de pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica i estudiar la seva relació amb la presència de BPP.

3.3. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE L'ESTUDI 2

El TACAR és una exploració complementària d'imatge habitual i de gran impacte en la pràctica habitual a la Pneumologia, que s'utilitza de forma extensa en la patologia intersticial difusa i que permet un estudi més detallat del parènquima pulmonar i de la via aèria, però no ha estat estudiada la seva potencial utilitat en el diagnòstic de la colonització bronquial.

3.3.1. Objectius primaris:

- Estudiar la utilitat del TACAR en el diagnòstic de la colonització bronquial en pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica.

3.3.2. Objectius secundaris:

- Establir patrons radiològics més freqüentment associats a colonització bronquial en subjectes amb MPOC greu en fase d'estabilitat clínica.

3.4. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE L'ESTUDI 3

La presència de bactèries a la via aèria de pacients amb MPOC estables genera inflamació i major nombre d'aguditzacions. La detecció de dites BPP és difícil mitjançant les tècniques no invasives actuals.

El nas electrònic és un dispositiu amb nano-sensors capaços d'identificar compostos volàtils orgànics (COVs) en l'aire exhalat de forma no invasiva, generant un patró de COVs mitjançant un software específic.

3.4.1. Objectius primaris:

- Estudiar la utilitat del nas electrònic en el diagnòstic de la colonització bronquial en pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica.

3.4.2. Objectius secundaris:

-Estudiar la utilitat del nas electrònic en diferenciar pacients amb MPOC colonitzats i no colonitzats respecte controls sans.

-Estudiar la sensibilitat i especificitat del nas electrònic en l'estudi d'individus amb MPOC colonitzats, no colonitzats i controls sans.

4. MATERIAL I MÈTODES

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI 1

4.1.1. Disseny de l'estudi

Es tracta d'un estudi prospectiu dissenyat per determinar els nivells de mucines i PAMs a l'esput i al RBA de pacients amb MPOC amb i sense BPP a la via aèria. L'estudi està inclòs en el *Clinical Trials*: ClinicalTrials. Gov identifier: NCT01976130.

El protocol de l'estudi va ser aprovat pel Comitè d'ètica institucional de l'Hospital de Sant Pau (IIBSP-ENO-2009-20) i tots els subjectes van signar el consentiment informat.

La mida mostral va ser calculada en base a l'estudi de Kirham *et al.* (33), en el qual es van detectar diferències estadísticament significatives en l'expressió de mucines a la via aèria quan es va comparar grups de 15 pacients amb MPOC. Per altra banda, prèviament s'havia descrit que el 30-50% dels pacients amb MPOC greu en fase d'estabilitat clínica presenten BPP a la via aèria (14,78). Per tant es va estimar que amb la inclusió de 40-45 pacients amb MPOC greu, podríem trobar 15 pacients amb BPP a la via aèria.

En tots els pacients inclosos en l'estudi, a part de les dades demogràfiques i funcionals, es va realitzar l'anàlisi sanguini i la recollida de l'esput induït previ a l'estudi endoscòpic.

4.1.2. Subjectes de l'estudi

Pacients amb MPOC moderat i greu ($FEV1 < 60\%$) diagnosticats d'acord a les guies actuals de la *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD), basat en la història clínica i els criteris espiromètrics (12), van ser inclosos en un hospital universitari de tercer nivell a Barcelona.

Els individus van ser exclosos si havien presentat infecció del tracte respiratori, exacerbació de la MPOC o hospitalització les 8 setmanes prèvies a la inclusió, així com si havien rebut antibiòtics i/o corticosteroides sistèmics en les darreres 8 setmanes. També van ser exclosos aquells pacients amb història de bronquièctasis, malaltia terminal o que presentessin contraindicació formal per realitzar-se una broncoscòpia.

4.1.3. Caracterització clínica i funcional

Es van recollir les dades demogràfiques, les característiques clíniques dels individus, el número d'exacerbacions presentades en el darrer any, el temps des de la darrera exacerbació, les comorbiditats rellevants i el tractament respiratori que prenen els pacients.

Es va realitzar espirometria a tots els subjectes inclosos en l'estudi (*Datospir-500*, *Sibelmed SA, Barcelona*) d'acord amb les guies de la *Sociedad Española de Neumología* (SEPAR) (79), utilitzant els valors predits de la població mediterrània (80).

4.1.4. Avaluació microbiològica

En tots els pacients amb MPOC es van obtenir les mostres mitjançant broncoscòpia i ús d'un raspall protegit estèril (*ConMed, New York, NY*) i posteriorment van ser processades utilitzant la metodologia convencional (81). En resum, es va fer una dilució seriada de les mostres en *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (01:10, 1: 100, 1: 1000). Totes les mostres microbiològiques es van cultivar en medis agar sang, xocolata, Wilkins-Chalgren i Sabouraud's i es van avaluar passades 72 hores. La càrrega bacteriana es va considerar significativa quan hi havia $\geq 10^2$ unitats formadores de colònies (UFC)/ml (82). D'acord amb els mètodes estàndard es va identificar microorganismes específics i es van classificar com a BPP (*Hemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, bacils Gram negatius, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*) o no-BPP (*Streptococcus viridans*, *Candida* spp, *Corynebacterium* spp, and *Staphylococcus epidermidis*) (48).

4.1.5. Esput induït

Mitjançant la tècnica d'inducció de l'esput i seguint la metodologia estàndard descrita prèviament, es van obtenir les mostres d'esput (83). A mode de resum, l'esput va ser recol·lectat directament en un recipient estèril i va ser separat de la saliva mitjançant inspecció visual. Els taps de moc es van pesar i diluir 4 vegades el seu pes en una solució de PBS. Posteriorment es va realitzar disgregació mecànica mitjançant la introducció de boles de vidre de 3mm (*SIGMA, Steinheim, Germany*) del mateix pes que els taps de moc i es va agitar en un agitador magnètic a 4°C durant 20 minuts. La suspensió resultant es va filtrar a través d'una malla de nylon de 50 µm *PARTEC Celltrics 47 µl (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany)* per eliminar els detritus sense eliminar el component cel·lular. El comptatge cel·lular total es va determinar mitjançant una càmera de Neubauer i la viabilitat cel·lular es va valorar amb la tinció de *Trypan Blue*. Posteriorment la mostra es va centrifugar a 2.000 rpm a 10°C i durant 5 minuts.

El sobrenedant lliure de cèl·lules es va recollir, va ser suplementat amb *Protease inhibitor Complet EDTA-free (ROCHE; Indianapolis, USA)* i va ser emmagatzemat a una temperatura de -40°C fins el seu processament final. El pellet cel·lular es va re-suspendre en una volum calculat de solució PBS x1 per obtenir una concentració de $0,5 - 1 \times 10^5$ cèl·lules/100µl.

4.1.6. Mostres endoscòpiques

En tots els pacients es van obtenir mostres endoscòpiques mitjançant broncoscòpia. Es va dur a terme un rentat broncoalveolar en el lòbul mig i un raspallat protegit per estudi microbiològic, seguint la metodologia estàndard prèviament descrita a les guies clíniques (84).

La mostra obtinguda mitjançant el rentat broncoalveolar va ser recollida en tubs i immediatament dipositada en gel per la seva preservació. Un terç del fluid recollit es va transferir en tubs amb àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA), per al recompte cel·lular diferencial. La resta de la mostra es va filtrar a través d'una malla de nylon de 50 µm *PARTEC Celltrics 47 µl (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany)*, centrifugada a 1750rpm durant 5 minuts i a una temperatura de -10°C,

per tal de separar la porció cel·lular del sobrenedant; aquest va ser emmagatzemat a una temperatura de -40°C fins al seu posterior processament.

4.1.7. Determinació dels nivells de mucines, alfa-defensina i IL-6

La determinació dels nivells de mucines es va realitzar mitjançant la tècnica de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) seguint les indicacions del kit comercial de *Uscn Life Science Inc (Wuhan, China)* específic per MUC 2 (*SEA705Hu*), per MUC 5AC (*SEA756Hu*) i per MUC 5B (*SEA684Hu*) i els nivells d'alfa-defensina mitjançant ELISA del kit comercial de *BlueGene (Shangai, China) E01D0149*. Els nivells de IL-6 es van determinar mitjançant tècnica d'ELISA amb el kit comercial R & D Systems, Abingdon, UK.

El rang de detecció de mucines dels ELISAs va ser de 1.56-100ng/ml per la MUC2, 78-5000pg/ml per la MUC5AC i 0.625-40ng/ml per la MUC5B. Els nivells de PAMs, concretament d'alfa-defensina es van determinar en rang 100-2500pg/ml i la IL-6 en rang de $\geq 8\text{ng/mL}$.

4.1.8. Anàlisi estadístic

Es va realitzar anàlisi mitjançant test paramètrics o no paramètrics, segons les variables presentessin distribució normal o no normal, respectivament. Els resultats es van expressar com a valors de mitja (SEM) o mitjana (rang), segons les variables presentessin o no distribució normal. Es va considerar estadísticament significatiu quan el valor de $p < 0.05$.

L'anàlisi es va realitzar utilitzant el programa SPSS versió 18 (SPSS Inc, Chicago, I) i l'anàlisi gràfic mitjançant el GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

4.2. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI 2

4.2.1. Disseny de l'estudi

Es tracta d'un estudi prospectiu dissenyat per determinar els patrons radiològics en pacients amb MPOC amb i sense BPP a la via aèria.

El protocol de l'estudi va ser aprovat pel Comitè d'ètica institucional de l'Hospital de Sant Pau (IIBSP-ENO-2009-20) i tots els subjectes van signar el consentiment informat.

En tots els pacients inclosos en l'estudi, a part de les dades demogràfiques i funcionals, es va realitzar i TACAR abans de l'estudi endoscòpic, aquest realitzat l'últim procediment per evitar possibles troballes secundàries al procediment endoscòpic.

4.2.2. Subjectes de l'estudi

Es van incloure pacients amb MPOC moderat i greu ($FEV1 < 60\%$) diagnosticats d'acord a les guies actuals de la GOLD, basat en la història clínica i els criteris espiromètrics (85), en un hospital de tercer nivell a Barcelona.

Els individus van ser exclosos si havien presentat infecció del tracte respiratori, exacerbació de la MPOC o hospitalització les 8 setmanes prèvies a la inclusió, així com si havien rebut antibiòtics i/o corticosteroides sistèmics en les darreres 8 setmanes. També van ser exclosos aquells pacients amb història de bronquièctasis, malaltia terminal o que presentessin contraindicació formal per realitzar-se una broncoscòpia.

4.2.3. Caracterització clínica i funcional

Es van recollir dades clíniques, demogràfiques i funcionals i es va realitzar la caracterització funcional respiratòria tal i com ha estat prèviament descrit en l'estudi 1.

4.2.4. Avaluació microbiològica

Es va procedir a l'avaluació microbiològica d'aquells individus amb MPOC tal i com descrit en l'estudi 1.

4.2.5. Mostres endoscòpiques

En tots els pacients amb MPOC es van obtenir mostres endoscòpiques mitjançant broncoscòpia, tal i com descrit en l'estudi 1.

4.2.6. L'adquisició de la imatge radiològica

L'equip utilitzat va ser el Phillips Brilliance TC 16C® (Phillips Medical Systems, DA Best, Països Baixos Charlotte, NC), que es tracta d'un equip d'última generació que s'utilitza per realitzar estudis per imatge en tomografia computeritzada.

El procediment per l'adquisició de les imatges es realitzà amb els subjectes realitzant una inspiració màxima, obtenint les imatges amb el programa d'alta resolució i des dels vèrtexs pulmonars fins a les bases. L'estudi es complementà amb 3 volums d'adquisició dinàmica expiratòria a diferents nivells (camps superiors, camps mitjos i camps inferiors). Finalment s'obtingueren reconstruccions transversals en finestra de parénquima pulmonar i de mediastí.

4.2.7. Els patrons radiològics mitjançant TACAR

Els patrons radiològics es defineixen com un seguit de troballes en les imatges radiològiques adquirides mitjançant una mateixa tècnica i que són comuns en diferents pacients i que poden associar-se a una o diverses entitats patològiques concretes.

Els signes TACAR avaluats que s'associen a infecció pulmonar són: impactacions bronquiolars o signe de l'arbre en gemmació ("tree in bud"), impactacions bronquials, engruïment de parets bronquials, opacitats en vidre esmerilat, nòduls, i condensació o opacitats alveolars (86,87).

També s'ha valorat la presència d'adenopaties mediastíniques, malaltia pleural (pneumotòrax, vessament pleural), pneumomediastí, i enfisema pulmonar (centracinar, paraseptal o mixte).

4.2.8. Anàlisi estadístic

Es va realitzar anàlisi mitjançant test paramètrics o no paramètrics, segons les variables presentessin distribució normal o no normal, respectivament. Els resultats es van expressar com a valors de mitja (SEM) o mitjana (rang), segons les variables presentessin o no distribució normal. Es va considerar estadísticament significatiu quan el valor de $p < 0.05$. L'anàlisi es va realitzar utilitzant el programa SPSS versió 18 (SPSS Inc, Chicago. I)

4.3. MATERIAL I MÈTODES DE L'ESTUDI 3

4.3.1. Disseny de l'estudi

Es tracta d'un estudi prospectiu en el qual es van incloure pacients amb MPOC amb i sense colonització bacteriana de la via aèria i subjectes controls sans. El mida mostral és similar a la d'estudis previs que utilitzant el mateix dispositiu i metodologia que l'actual, van identificar diferències estadísticament significatives entre els grups estudiats (70-72,84). Les dades estan registrades al ClinicalTrials.Gov identifier: NCT01976117.

El protocol de l'estudi va ser aprovat pel Comitè d'ètica institucional de l'Hospital de Sant Pau (IIBSP-ENO-2009-21) i tots els subjectes van signar el consentiment informat.

4.3.2. Subjectes de l'estudi

Es van incloure pacients amb el diagnòstic de MPOC, d'acord a les guies actuals de la GOLD (88) i la presència de colonització bacteriana de la via aèria segons el resultat del raspallat protegit, tal i com s'ha descrit prèviament a l'estudi 1.

Els individus van ser exclosos si havien presentat infecció del tracte respiratori, exacerbació de la MPOC o hospitalització les 8 setmanes prèvies a la inclusió, així com si havien rebut antibiòtics i/o corticosteroides sistèmics en les darreres 8 setmanes. També van ser exclosos aquells pacients amb història de bronquièctasis, malaltia terminal o que presentessin contraindicació formal per realitzar-se una broncoscòpia.

4.3.3. Caracterització clínica i funcional

Es van recollir dades demogràfiques i clíniques, així com estudi amb espirometria en tots els subjectes de l'estudi, tal i com està reflectit a l'estudi 1.

4.3.4. Avaluació microbiològica

Es va procedir a l'avaluació microbiològica d'aquells individus amb MPOC tal i com s'ha descrit a l'estudi 1.

4.3.5. Mostres endoscòpiques

En tots els pacients amb MPOC es van obtenir mostres endoscòpiques mitjançant broncoscòpia, de la forma descrita a l'estudi 1.

4.3.6. Mesura dels COVs mitjançant el nas electrònic

La mostra de l'aire exhalat es va obtenir abans del procediment endoscòpic en els pacients amb MPOC, i no estava permesa la ingesta, i la medicació inhalada durant les 12 hores prèvies a l'estudi.

Per la determinació dels COVs, el gas exhalat va ser recollit tal i com es descriu a continuació seguint el prèviament ja descrit a la literatura (72,73). En resum, els subjectes van respirar durant 3 minuts a través d'una vàlvula Hans Rudolph amb un filtre inspiratori NBQ i un reservori expiratori de sílice que permet eliminar la humitat de l'aire. Posterior a aquest temps els individus realitzaven una maniobra d'inspiració màxima i l'aire espirat es recollia a la bossa de Tedlar de 10 litres de capacitat. Seguidament, s'introduïa a la bossa de Tedlar el sensor extern del nas electrònic durant 5 minuts per exposar la mostra als 32 nano-sensors del nas electrònic Cyranose 320 ®. La variació de la resistència en cada sensor exposat a

la barreja de COVs generava un resultat, així els canvis en la resistència elèctrica dels 32 sensors del nas electrònic generaven un perfil d'empremta olfactiva (patró de COVs) en cada individu (70-73).

4.3.7. Anàlisi dels patrons de COVs

Les dades de les empremtes olfactives dels pacients amb MPOC (colonitzats i no colonitzats) i dels controls es van comparar utilitzant l'aplicació de reconeixement de patró creada en el software MATLAB (v.R2012a). Es van representar mitjançant regressió logística en gràfics mono- o bidimensionals (72,73).

Per analitzar les dades obtingudes mitjançant el nas electrònic, es va realitzar un anàlisi per component principal (PCA) de 3 factors principals, que permetia la simplificació de les dades. Aquests factors PCA es van analitzar mitjançant el test d'ANOVA univariant, seguit d'un test post-hoc. La classificació resultant dels pacients basada en aquests factors PCA, es va dur a terme utilitzant l'anàlisi discriminant lineal, calculat com aquell que obté un major percentatge de pacients correctament classificats.

La funció discriminant s'entrenava mitjançant totes excepte una de les mostres dels subjectes. A continuació la resta de les mostres dels subjectes eren analitzades i si 3 o 4 de les mostres es classificaven a la classe real, es considerava el subjecte com "ben classificat". Es repetia el procediment amb tots els subjectes disponibles i així es generava el percentatge dels correctament classificats. Aquest mètode és conegut com "*leave-one-out*" (73).

Es va considerar estadísticament significatiu un valor de p menor a 0.05 per la funció discriminant entrenada. Es va generar una corba ROC (ROC, *Receiver Operating Characteristics*) utilitzant els resultats de la funció discriminant i combinant totes les mostres d'un subjecte. L'àrea sota la corba (AUROC) es va calcular utilitzant la regressió logística múltiple.

5. RESULTATS

5. RESULTATS

5.1. RESULTATS DE L'ESTUDI 1

5.1.1. Característiques dels subjectes

Es van incloure un total de 45 pacients amb MPOC, amb edat mitja (desviació estàndard) de 67 (± 8) anys, i que presentaven una mitja de FEV1 del 41 (± 10)% del predit. En 14/45 (31%) dels individus les mostres endoscòpiques van ser positives per BPP, és a dir es van considerar que presentaven colonització per BPP.

Entre el grup dels subjectes colonitzats per BPP i el grup de no colonitzats no es van detectar diferències significatives pel que fa a les característiques demogràfiques, ni funcionals. Tampoc es van observar diferències pel que fa al percentatge de subjectes fumadors i ex-fumadors o en la dosi acumulada de paquets any. No hi han haver diferències en l'ús dels diferents tractaments inhaladors per la MPOC entre ambdós grups.

Per altra banda, en el grup d'individus amb MPOC estable amb colonització de la via aèria per BPP, es va observar que hi havia un índex més elevat d'haver presentat dues o més exacerbacions en el darrer any (50% vs. 16%, $p=0,02$) i que presentaven un període de temps des de la darrera exacerbació més curt (13 ± 5 vs. 22 ± 1 setmanes, $p=0,03$). Totes les característiques demogràfiques i funcionals recollides estan representades a la taula 6.

5.1.2. Característiques microbiològiques

Catorze dels 45 subjectes van presentar estudi microbiològic de les mostres endoscòpiques positiu per BPP. En la taula 7 estan representats els microorganismes i la càrrega bacteriana aïllats; observant-se que l'*Haemophilus influenza* va ser el més prevalent, seguit de *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catharralis*.

5.1.3. Nivells de mucines en esput i en RBA

Es van determinar els nivells de les mucines secretores MUC 2, MUC 5AC i MUCB, en tots els subjectes inclosos i es van comparar els nivells entre el grup de pacients amb BPP i els que no presentaven BPP a la via aèria.

En l'esput induït dels pacients amb MPOC els nivells mitjos (\pm desviació estàndard [DE]) detectats de la mucina secretora MUC 2 van ser els més elevats, essent de 52,4 (\pm 32,8) ng/ml. Els nivells detectats de la MUC5B van ser de 12,2 (\pm 14,9) ng/ml i els nivells de la MUC5AC de 674,2 (\pm 179,1) pg/ml. A la mostra del RBA els nivells de la MUC 2 van ser també els més elevats de 8,1 (\pm 4,4) ng/ml; els nivells de la MUC5B van ser de 6,4 (\pm 4,0) ng/ml i de la MUC 5AC de 80,3 (\pm 11,2) pg/ml.

Al comparar el grup de colonitzats vs. no colonitzats, es va observar que els nivells de MUC2 van ser inferiors en aquells pacients amb colonització bacteriana tant en el RBA (6,36 \pm 1,3 vs. 8,9 \pm 4,9 ng/ml, $p=0,029$) com en l'esput (34,76 \pm 28,08 vs. 59,9 \pm 30,77ng/ml, $p=0,017$). No es van detectar diferències estadísticament significatives en els nivells de MUC 5B i 5AC ni en la RBA ni en l'esput (taula 8, figura 8).

5.1.4. Marcadors d'inflamació i alfa-1-defensina a la via aèria

Els nivells d'alfa-1-defensina detectats en les mostres d'esput van mostrar que els subjectes amb colonització presentaven nivells més alts d'alfa-1-defensina respecte els no-colonitzats (1244,4 \pm 250,2 vs. 498,8 \pm 153,6 ng/ml, $p=0,01$). En la RBA els nivells d'alfa-1-defensina també eren majors en els colonitzats (143,2 \pm 33,2 vs. 101,1 \pm 12,2 pg/ml, $p=0,2$), tot i que les diferències no van ser estadísticament significatives (taula 8, figura 9).

Pel que fa als marcadors d'inflamació, els nivells de IL-6 determinats en l'esput van resultar més elevats en el grup de subjectes colonitzats respecte els no-colonitzats (1948,5 \pm 476,7 vs. 389,1 \pm 127,2 ng/mL, $p<0,001$) (taula 8, figura 10).

5.1.5. Correlació entre els nivells de mucines i funcionalisme pulmonar i inflamació de la via aèria

Es va valorar mitjançant el coeficient de correlació la relació entre el nivell d'inflamació i el nivell de mucines a la via aèria i es va observar una correlació inversa entre nivells de IL-6 i MUC 2 en l'esput ($r = -0,40$, $p = 0,01$) (figura 11). No es va detectar correlació entre IL-6 i la resta de mucines, ni amb l'alfa-1-defensina. Tampoc es va detectar correlació entre els nivells de mucines i la càrrega bacteriana o el tabaquisme. Per altra banda, es va detectar una correlació directa entre els nivells de MUC 2 i el FEV1 ($r = 0,355$, $p = 0,04$) (figura 12).

Taula 6. Característiques clíniques i demogràfiques dels pacients amb MPOC.

	Pacients MPOC Colonitzats (n=14)	Pacients MPOC no-colonitzats (n=31)	Valor de p
Edat (anys)	68,71 (± 10,87)	66,42 (± 7,33)	0,07
Home/dona	11/3	26/5	0,6
IMC	25,17 (± 5,03)	26,02 (± 3,94)	0,34
Malaltia cardíaca crònica	3 (21,4%)	9 (29,0%)	0,5
Malaltia maligna prèvia	2 (14,3%)	5 (16,1%)	0,8
Malaltia renal crònica	0	2 (6,5%)	0,3
Diabetis Mellitus	4 (28,6%)	4 (12,9%)	0,2
Hipertensió arterial	8 (57,1%)	17 (54,8%)	0,8
Accident vascular cerebral	1 (7,1%)	1 (3,2%)	0,5
Depressió	2 (14,3%)	9 (29%)	0,2
Fumador/ ex-fumador	5/9	11/20	0,6
Paquets/any	59,44 (± 24,81)	52,00 (± 17,50)	0,3
FEV ₁ %	37,29 (± 7,85)	43,13 (± 10,77)	0,26
FEV ₁ L	1,075 (± 0,31)	1,30 (± 0,44)	0,10
Leucòcits	7653,64 (± 1348,54)	7438,40 (± 2245,16)	0,35
Neutròfils absoluts	4961,43 (± 600,15)	4319,33 (± 238,91)	0,16
Neutròfils percentatge	62,77 (± 5,04)	60,72 (± 7,49)	0,25
PCR (mg/L)	5,47 (± 3,47)	8,63 (± 114,68)	0,14
Albúmina	40,10 (± 4,14)	41,33 (± 2,94)	0,28
Ús de CI	12 (85,7%)	30 (96,8%)	0,1
Ús de LABA	14 (100%)	30 (96,8%)	0,4
Ús de LAMA	12 (85,7%)	27 (87%)	0,8
Ús de Roflumilast	1 (7,1%)	2 (6,5%)	0,9
Exacerbació prèvia	8 (57,1%)	13 (41,9%)	0,5
Exacerbadors freqüents	7 (50%)	5 (16,1%)	0,02
Temps de la darrera agudització (setmanes)	12,75 (± 4,7)	21,87 (± 14,4)	0,03

Valors expressats en mitja (+/- desviació estàndard). IMC: índex de massa corporal; FEV₁: volum expiratori el primer segon; CI: corticoides inhalats; LABA: agonistes beta-adrenèrgics de llarga durada; LAMA: antagonistes muscarínics de llarga durada.

Taula 7. Bactèries potencialment patògenes i càrrega bacteriana aïllades en RP en ordre de freqüència.

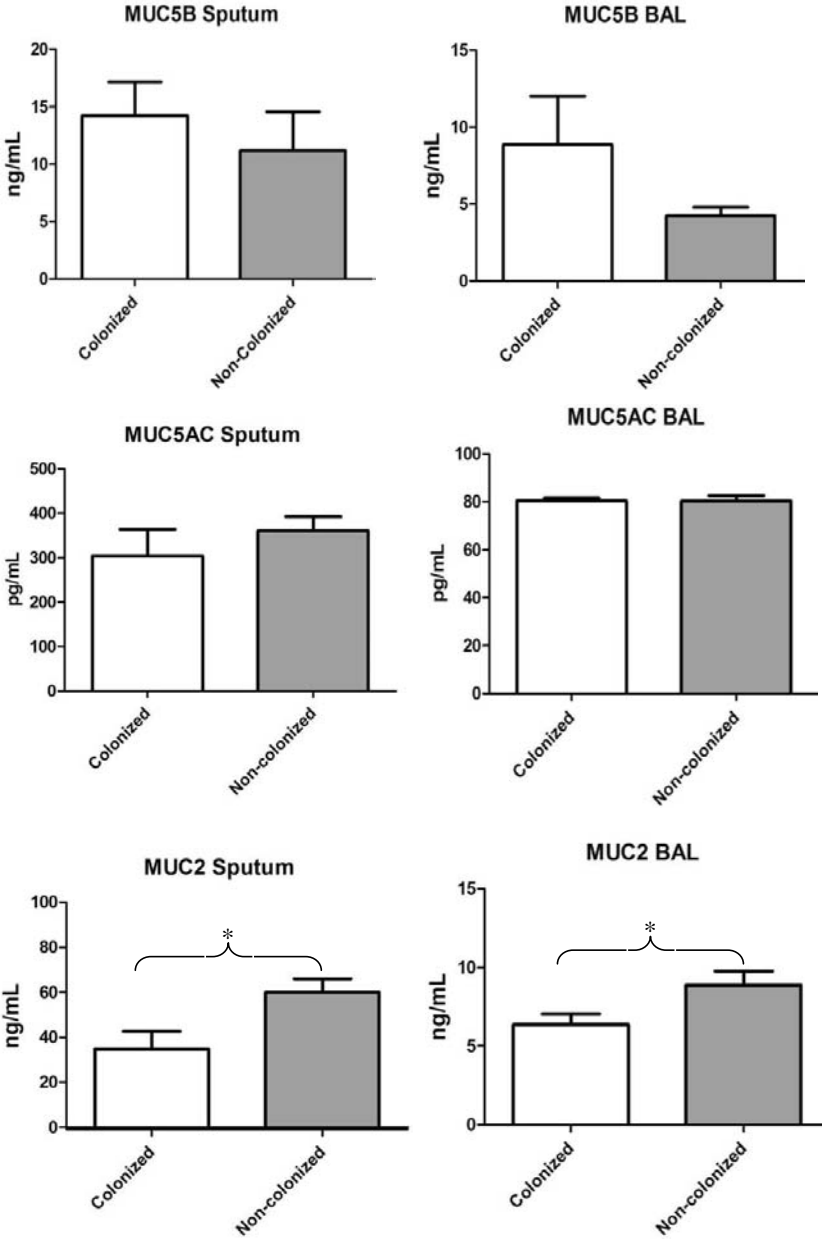
BPP	N= 14 (%)	≥10 ² ufc/mL n (%)	≥10 ³ ufc/mL n (%)	≥10 ⁴ ufc/mL n (%)
<i>Haemophilus influenza</i>	8 (57.1%)	4 (50%)	4 (50%)	
<i>S. pneumonia</i>	2 (14.3%)		1 (50%)	1 (50%)
<i>Moraxella catharralis</i>	2 (14.3%)		2 (100%)	
<i>Eschericia coli</i>	1 (7.1%)		1 (100%)	
<i>Neisseria meningitidis</i>	1 (7.1%)			1 (100%)

Taula 8. Nivells en RBA i en esput de les mucines secretores, l'alfa-1-defensina i la IL-6 de la via aèria de subjectes amb MPOC.

Nivells mucines	Pacients MPOC no colonitzats per BPP	Pacients MPOC colonitzats per BPP	Valor de p
MUC 2 en esput	59,9 (±30,77) ng/mL	34,76 (±28,08) ng/mL	0,017
MUC 2 en RBA	8,88 (±4,9) ng/mL	6,36 (±2,2) ng/mL	0,029
MUC 5B en esput	11,19 (±16,93) ng/mL	14,22 (±10,58) ng/mL	0,50
MUC 5B en RBA	4,24 (±3,06) ng/mL	8,87 (±10,89) ng/mL	0,17
MUC 5AC en esput	360,11 (± 159,17) pg/mL	304,39 (±214,47) pg/mL	0,42
MUC 5AC en RBA	80,34 (±13,00) pg/mL	80,31 (±4,32) pg/mL	0,99
Alfa-defensina en esput	498,8 (± 153,6) pg/mL	1244,4 (± 250,2) pg/mL	0,01
Alfa-defensina en RBA	101,1 (± 12,2) pg/mL	143,2 (± 33,2) pg/mL	0,20
IL-6 en esput	389,1 (± 127,2) ng/mL	1948,5 (± 476,7) ng/mL	0,001

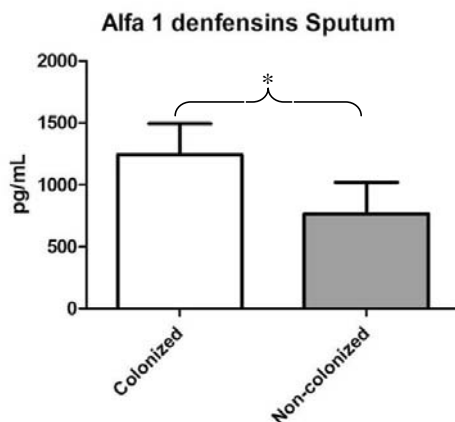
MUC: mucina; RBA: rentada broncoalveolar; IL: interleucina. Valors expressats en mitja +/- desviació estàndard. El valor de p es considera significatiu si <0,05.

Figura 8. Nivells de mucines secretores en l'esput i en el RBA de pacients amb MPOC colonitzats i no colonitzats per BPP.



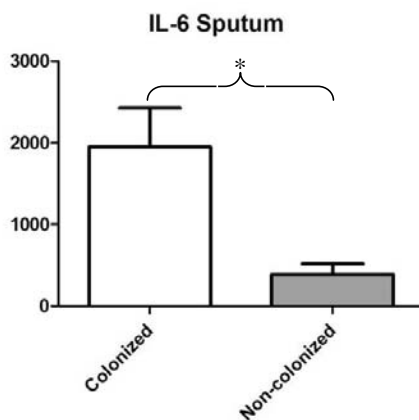
Valors expressats en mitjana i error estàndard de la mitjana. * Valor de $p < 0,05$

Figura 9. Nivells d'alfa-1-defensina en l'esput de pacients amb MPOC.



Valors expressats en mitjana i error estàndard de la mitjana. * Valor de $p < 0,05$

Figura 10. Nivells de IL-6 en l'esput dels subjectes amb MPOC.



Valors expressats en mitjana i error estàndard de la mitjana. * Valor de $p < 0,05$

Figura 11. Relació entre els nivells de MUC2 i IL-6 en l'esput.

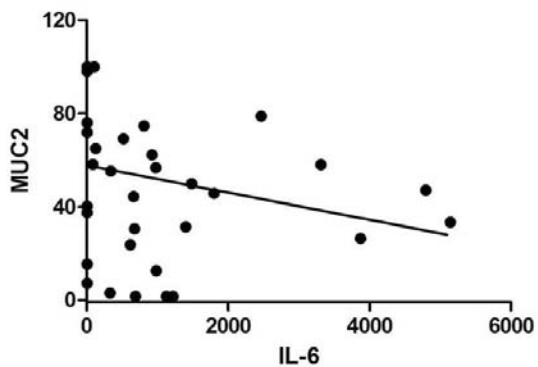
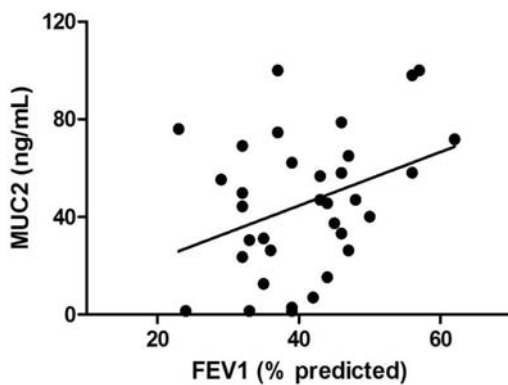


Figura 12. Relació entre els nivells de MUC2 i FEV1.



5.2. RESULTATS DE L'ESTUDI 2

5.2.1. Característiques dels subjectes

Es van incloure un total de 45 pacients amb MPOC moderat-greu, amb i sense BPP a la via aèria (n=14 i n=31, respectivament). Totes les característiques demogràfiques i funcionals recollides dels subjectes inclosos en l'estudi estan representades a la taula 9. Cal destacar que no es van observar diferències entre els grups pel que fa a l'edat, el sexe, l'índex de massa corporal (IMC) ni la proporció de fumadors. Tampoc es van detectar diferències estadísticament significatives pel que fa a la obstrucció al flux aeri (classificació de la GOLD) ni al tractament inhalador. Destaca que en el grup de colonitzats hi havia un percentatge més alt d'exacerbadors freqüents que en el grup de no colonitzats i que va ser estadísticament significatiu (n=7 (50%) vs. n=5 (16,13%), respectivament, p=0,029).

5.2.2. Patrons radiològics mitjançant la TACAR

Les diferents troballes radiològiques estudiades no van mostrar un patró de presentació diferent en el grup de colonitzats respecte el grup de no colonitzats, els resultats es mostren a la taula 10. És a dir que la TACAR no detectava diferències en els patrons radiològics estudiats entre els subjectes amb colonització respecte aquells sense colonització.

Es van analitzar els patrons radiològics i la distribució d'aquests en tots els subjectes inclosos en l'estudi. Els patrons radiològics detectats en el grup de pacients amb MPOC colonitzats per ordre de freqüència foren l'emfisema que es va trobar en la totalitat dels subjectes amb colonització (100%), l'engruiximent de les parets bronquials (92,9%), la presència de limfadenopaties mediastíniques (42,9%), l'alteració de l'espai aeri (35,7%), la bronquiolitis cel·lular (21,4%) i no es va detectar vidre esmerilat en cap subjecte (taula 11, figura 13).

Taula 9. Característiques clíniques i demogràfiques dels pacients amb MPOC.

	Pacients MPOC colonitzats (n=14)	Pacients MPOC no-colonitzats (n=31)	Valor de p
Edat (anys)	68,71 (± 10,86)	66,81 (± 7,38)	0,5
Home/dona	11/3	26/5	0,7
IMC	25,17 (± 5,03)	26,14 (± 3,79)	0,5
Fumador/ ex-fumador	5/9	10/21	0,8
FEV ₁ %	37,29 (± 7,85)	42,68 (± 10,38)	0,09
FEV ₁ L	1,08 (± 0,31)	1,25 (± 0,37)	0,1
Paquets/any	59,44 (± 24,80)	49,09 (± 13,24)	0,1
Ús de CI	12 (85,71%)	30 (100%)	0,2
Ús de LABA	14 (100%)	30 (96,8%)	0,5
Ús de LAMA	12 (85,71%)	27 (87,09%)	0,9
Ús de Roflumilast	1 (7,14%)	2 (6,45%)	0,9
Leucòcits /uL	7653,64 (±1348,53)	7213,60 (± 2281,90)	0,6
Neutròfils %	62,77 (± 5,04)	60,70 (± 7,51)	0,5
PCR mg/L	5,47 (± 3,78)	7,94 (± 14,41)	0,6
Exacerbadors freqüents	7 (50%)	5 (16,1%)	0,029
Temps de la darrera agudització (setmanes)	12,75 (± 4,74)	21,87 (± 14,38)	0,09

Valors expressats en mitja (+/- desviació estàndard). IMC: índex de massa corporal; FEV1: volum expiratori el primer segon; CI: corticoides inhalats; LABA: agonistes beta-adrenèrgics de llarga durada; LAMA: antagonistes muscarínics de llarga durada.

Taula 10. Troballes en la TACAR dels diferents signes radiològics d'infecció pulmonar en pacients amb MPOC colonitzats i no colonitzats.

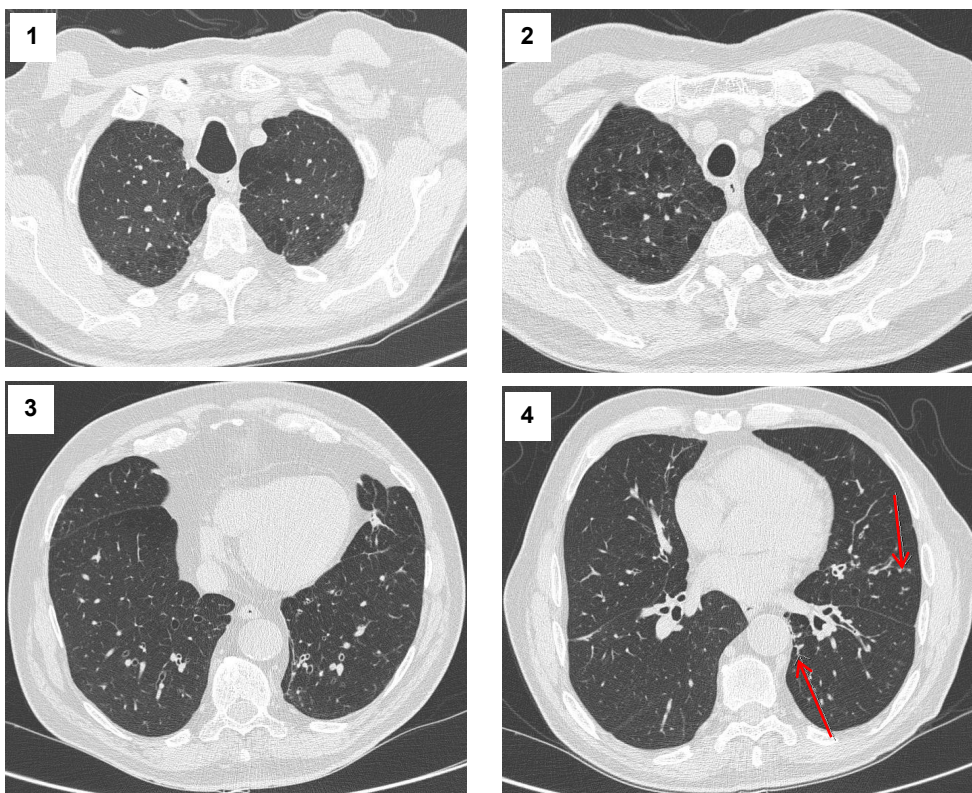
Signes TACAR	Pacients MPOC colonitzats n= 14	Pacients MPOC no-colonitzats n=31	Valor de p
Emfisema:	14 (100%)	27 (81,7%)	0,16
centroacinar	10 (71,4%)	24 (77,4%)	0,67
paraseptal	4 (28,6%)	5 (16,1%)	0,33
bilateral	12 (85,7%)	22 (71%)	0,29
LLSS	5 (35,7%)	12 (38,7%)	0,85
LLII	0	0	
LLII i LLSS	8 (57,1)	12 (38,7%)	0,25
apical	0	0	
paramediastínic	1 (7,1%)	1 (3,2%)	0,56
subpleural	1 (7,1%)	0 (0%)	0,13
Engruiximent de les parets bronquials:	13 (92,9%)	27 (87,1%)	0,57
Difús	11 (78,6%)	26 (83,9%)	0,67
Bronquiolitis cel·lular (arbre en gemmació):	3 (21,4%)	8 (25,8%)	0,75
bilateral	1 (7,1%)	2 (6,5%)	0,93
patró multifocal	0 (0%)	3 (9,7%)	0,23
patró difús	0 (0%)	0 (0%)	
focal	2 (14,3%)	5 (16,1%)	0,87
Vidre esmerilat:	0 (0%)	2 (6,5%)	0,34
bilateral	0 (0%)	1 (3,9%)	0,49
patró multifocals	0 (0%)	1 (3,9%)	0,49
patró difús	0 (0%)	0 (0%)	
focal	0 (0%)	1 (3,9%)	0,49
Alteració de l'espai aeri:	5 (35,7%)	10 (32,3%)	0,82
bilateral	0 (0%)	0 (0%)	
focal	2 (0%)	5 (16,1%)	0,87
multifocal	0 (0%)	0 (0%)	
parxejada	0 (0%)	0 (0%)	
broncograma aeri	1 (7,1%)	3 (9,7%)	0,78
cavitació	0 (0%)	0 (0%)	
atelèctasis	5 (16,1%)	2 (14,3%)	0,87
Limfadenopaties mediastíniques	6 (42,9%)	7 (22,6%)	0,17
Atrapament aeri:	0 (0%)	7 (22,6%)	0,05
bilateral	0 (0%)	5 (16,7%)	0,11
focal	0 (0%)	3 (9,7%)	0,23
multifocal	0 (0%)	1 (3,2%)	0,49
Alteracions pleurals	2 (14,3%)	1 (3,2%)	0,17

LLII: lòbuls inferiors; LLSS: lòbuls superiors.

Taula 11. Troballes radiològiques en els subjectes amb MPOC colonitzats per ordre de freqüència:

Troballes TACAR	n (%)
Emfisema	14 (100%)
Engruiximent de les parets bronquials	13 (92,9%)
Limfadenopaties mediastínicas	6 (42,9%)
Alteració de l'espai aeri	5 (35,7%)
Bronquiolitis cel·lular (arbre en gemmació):	3 (21,4%)
Alteracions de la pleura	2 (14,3%)
Vidre esmerilat	0

Figura 13. Imatges de TACAR de les troballes radiològiques.



1) emfisema centracinari i paraseptal; 2) emfisema centracinari; 3) engruiximent de parets bronquials 4) impactacions bronquiolars ("tree in bud") (fletxes).

5.3. RESULTATS DE L'ESTUDI 3

5.3.1. Característiques dels subjectes

Es van incloure un total de 37 pacients amb MPOC moderat-greu i 13 controls sans. Els cultius dels RBP van resultar positius en 10 (un 27%) subjectes amb MPOC (27%) i negatius en 27 (73%), considerant-se els primers colonitzats i els segons no colonitzats per BPP.

Les principals característiques dels participants en l'estudi, estan representades a la taula 12. No es van observar diferències entre els grups pel que fa a l'edat, el sexe, l'índex de massa corporal (IMC). Entre el grup de subjectes amb MPOC colonitzats i no-colonitzats no es van detectar diferències estadísticament significatives pel que fa a la proporció de fumadors, la obstrucció al flux aeri (classificació de la GOLD) ni al tractament inhalador però hi havia una tendència a presentar un menor valor de FEV1 ($1,04 \pm 0,37$ L vs. $1,27 \pm 0,37$ L, $p= 0,07$), menor temps des de la darrera agudització ($15,0 \pm 6,2$ setmanes vs. $20,7 \pm 14,5$ setmanes, $p= 0,81$) i un major percentatge de subjectes d'aguditzadors freqüents (30% vs. 15%, $p = 0,6$) en el grup de pacients amb colonització de la via aèria respecte els no-colonitzats.

5.3.2. Característiques microbiològiques

Pel que fa a la microbiologia, els gèrmens potencialment patògens aïllats en el cultiu del RP van ser: *H. influenzae* en 5 pacients, *M. Catarrhalis* en 2 pacients i *S. pneumoniae*, *E. coli* i *N. meningitidis* en 1 pacient (taula 13).

Taula 12. Característiques clíniques i demogràfiques dels pacients amb MPOC.

	Pacients MPOC colonitzats (n=10)	Pacients MPOC no-colonitzats (n=27)	Subjectes sans (n=13)
Edat (anys)	68,1 (± 10,9)	67,8 (± 6,9)	62,8 (± 5,2)
Home/dona	8/2	20/7	9/4
IMC	26,1 (± 4,0)	24,1 (± 5,5)	26,9 (± 3,1)
Fumador / ex-fumador	4/6	9/18	5/5
FEV ₁ %	38 (± 8)	42 (± 8)	99 (± 10)
FEV ₁ L	1,04 (± 0,37)	1,27 (± 0,32)	2,67(± 0,54)
Paquets/any	43 (± 8,3)	48,9 (± 13,8)	16,5 (± 15,3)
Ús de CI	9 (90%)	27 (100%)	NA
Ús de LABA	10 (100%)	27 (100%)	NA
Ús de LAMA	9 (90%)	25 (92%)	NA
Ús de Roflumilast	1 (10%)	2 (7%)	NA
Exacerbació prèvia	4 (40%)	12 (44%)	NA
Exacerbadors freqüents	3 (30%)	4 (15%)	NA
Temps de la darrera agudització (setmanes)	15,0 (± 6,2)	20,7 (± 14,5)	NA

Valors expressats en mitja (±desviació estàndard).IMC: índex de massa corporal; FEV1: volum expiratori el primer segon; CI: corticoides inhalats; LABA: agonistes beta-adrenèrgics de llarga durada; LAMA: antagonistes muscarínics de llarga durada; NA: no aplicable.

Taula 13. Bactèries potencialment patògenes aïllades en el cultiu del RP.

Bactèries potencialment patògenes	N= 10 (%)
<i>Haemophilus influenza</i>	5 (50%)
<i>Moraxella catharralis</i>	2 (20%)
<i>S. pneumonia</i>	1 (10%)
<i>Eschericia coli</i>	1 (10%)
<i>Neisseria meningitides</i>	1 (10%)

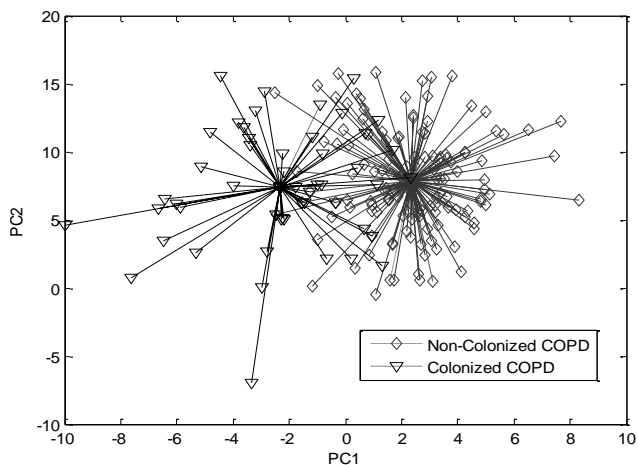
5.3.3. Anàlisi de les empremtes olfactòries

L'anàlisi realitzat de les empremtes olfactòries permet una distinció visual dels patrons generats de l'aire exhalat dels pacients colonitzats respecte els dels no colonitzats, tal i com es mostra a la figura 14.

L'anàlisi discriminant lineal realitzat va mostrar una correcta capacitat per classificar els MPOC en colonitzats i no colonitzats determinat per una *cross-validated accuracy* (CVA) del 89% ($p < 0.001$). La corba AUROC resultant va ser 0.92, amb una sensibilitat del 82% i una especificitat del 96% (taula 14, figura 15). Així mateix també permetia una discriminació visual de les empremtes olfactòries quan es comparava el grup de MPOC colonitzats versus controls sans i els MPOC no colonitzats versus els controls sans (figura 16). En la primera comparació d'empremtes entre grups la CVA era del 88% ($p < 0.004$), AUROC del 0,98 i presentava una sensibilitat del 80% i especificitat del 93%. En la segona comparació d'empremtes dels grups de subjectes mencionats hi havia una CVA del 83% ($p < 0.001$), AUROC del 0,93, sensibilitat del 81% i especificitat del 86% (taula 14).

Finalment l'estudi mitjançant l'e-nose i les empremtes olfactòries permetia discriminar entre el grup de MPOC (sense diferenciar entre colonitzats i no colonitzats) respecte els subjectes sans amb una CVA del 79% ($p < 0.0001$), AUROC del 0.89, una sensibilitat del 83% i especificitat del 76%.

Figura 14. Gràfic bidimensional de les empremtes olfactòries mitjançant anàlisi per component principal de pacients amb MPOC colonitzats i no-colonitzats.



* Presenta una CVA del 89% ($p < 0,0001$)

Figura 15. Àrea sota la corba (AUROC) del model predictiu del nas electrònic sobre la presència de colonització bacteriana de la via aèria dels pacients amb MPOC.

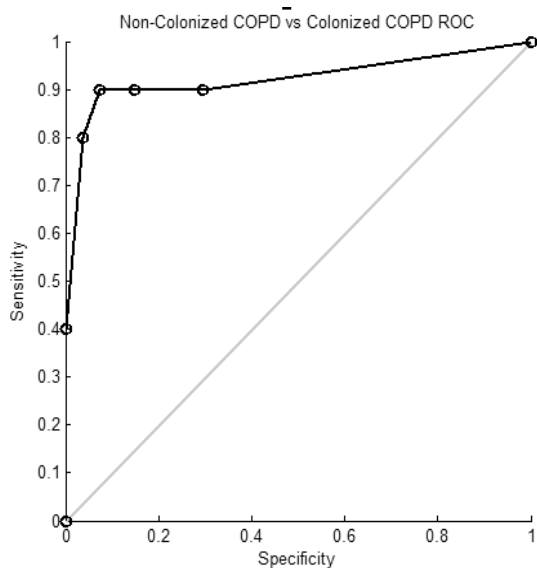
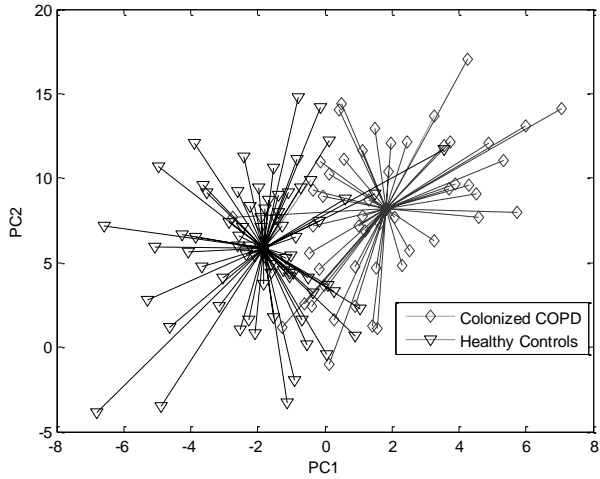
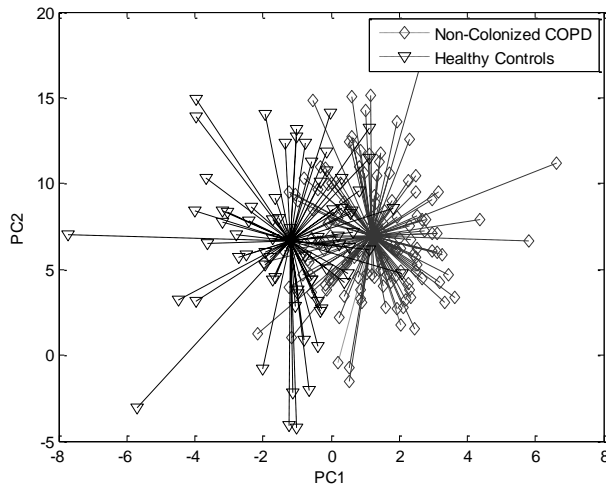


Figura 16. Gràfic bidimensional de les empremtes olfàctories mitjançant anàlisi per component principal de pacients amb MPOC colonitzats i controls sans (A), i de pacients amb MPOC no-colonitzats i controls sans (B).



* Presenta una CVA del 88% ($p < 0,004$)



*Presenta una CVA del 83% ($p < 0,001$)

Taula 14. Anàlisi ROC (*Receiver operating characteristics analysis*) de les empremtes olfactòries entre els pacients MPOC colonitzats i no-colonitzats, i controls sans.

	Pacients amb MPOC colonitzats vs. no colonitzats	Pacients amb MPOC colonitzats vs. controls sans	Pacients amb MPOC no-colonitzats vs. controls sans
<i>Cross-validated accuracy</i>	89%	88%	83%
Sensibilitat	0,82	0,80	0,81
Especificitat	0,96	0,93	0,86
AUROC	0,922	0,986	0,937
Valor predictiu positiu	0,87	0,89	0,92
Valor predictiu negatiu	0,92	0,87	0,72

AUROC: area under the receiver operating characteristic; MPOC: malaltia pulmonar obstructiva crònica.

6. DISCUSSIÓ

6. DISCUSSIÓ

En la MPOC greu la colonització bacteriana juga un paper important en el curs de la malaltia. En l'actualitat els mecanismes pels quals alguns pacients presenten colonització i d'altres no, no és conegut, i per altra banda els sistemes actuals per poder diagnosticar la presència de BPP tenen importants limitacions.

En aquesta tesi hi ha tres treballs diferenciats que valoren per una banda els possibles mecanismes involucrats en la colonització bacteriana de la via aèria dels subjectes amb MPOC i per altra nous possibles mètodes per al diagnòstic de la presència d'aquestes BPP.

6.1. DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI 1

Les mucines tenen la tasca de conferir les correctes característiques del moc pel conseqüent correcte funcionament del sistema muco-ciliar. Són una barrera i participen del sistema de defensa de la via aèria (29). Els pacients amb MPOC, sobretot amb bronquitis crònica, tenen una major producció de moc que ha estat associada a una major caiguda de la funció pulmonar i a un major risc d'exacerbacions (89,90). S'ha parlat de la possible implicació de la hipersecreció mucosa en la fisiopatologia i l'evolució natural de la MPOC, malgrat això hi ha poques dades sobre les característiques i la composició del moc en aquests pacients (91).

En aquesta tesi es va avaluar el contingut de les mucines secretores tant en l'esput com en la RBA i es va observar que la MUC 2 presentava els nivells més alts de les mucines secretores estudiades, seguit de la MUC 5 i finalment la MUC 5AC. Pel que fa als valors obtinguts en la RBA i en l'esput induït cal destacar que es respectava l'ordre de representació de les mucines a la via aèria, essent la MUC 2 la més elevada. També es va observar que els valors més baixos de MUC 2 en esput es correlacionaven amb un FEV1 més baix, tot

i que no es van detectar diferències en el FEV1 entre els grups de colonitzats i no colonitzats.

Malgrat que en estudis previs en individus amb MPOC es van detectar com a majoritàries les mucines secretores a la via aèria la MUC 5AC i MUC 5B (35,92), tots els treballs prèviament publicats coincideixen en que els nivells de mucines secretores de la via aèria estan alterats en la MPOC i es relacionen amb la funció pulmonar. El grup de Kirham *et al.* van descriure que els subjectes amb MPOC presentaven una composició de les principals mucines en l'esput diferent respecte els individus fumadors sense obstrucció al flux aeri (majors nivells de MUC 5B i MUC 5AC, respectivament). I en aquest estudi es van correlacionar els nivells elevats de MUC 5B en esput amb un menor FEV₁ (33). Un altre estudi va detectar que l'expressió de la mucina secretora MUC 5AC estava augmentada en les glàndules bronquials submucoses els subjectes amb MPOC moderat en fase d'estabilitat clínica i es va trobar una correlació inversa entre l'expressió de la MUC 5AC a la superfície de l'epiteli bronquial i el FEV₁ (34). Finalment un treball de Chillapagary *et al.*, mostrà que els individus amb MPOC moderada-greu presentaven nivells més alts de mucines MUC 5AC i MUC 5B en l'esput quan es comparava amb controls sans (93).

És conegut que la colonització bacteriana de la via aèria té un paper significatiu en la evolució i història natural de la MPOC (22). La presència de BPP a la via aèria de forma crònica té com a conseqüència un augment de la inflamació de la via aèria i s'ha postulat que aquest fet altera els sistemes de defensa pulmonar (17,18,94), essent el grup de pacients amb infecció bronquial crònica els que presenten major nombre d'exacerbacions, més events negatius i un major declinar de la funció pulmonar (19,20). Malgrat el fet de tenir o no BPP a la via aèria és cabdal en l'evolució de la MPOC, el motiu pel qual alguns pacients es colonitzen i d'altres no, no està aclarit.

Les mucines s'han definit com a potencials agents microbians naturals (95). Així en el tracte gastrointestinal hi ha estudis on es parla de la funció antibacteriana de les mucines sobre l'*Helicobacter pylori* (96) i del paper indispensable de la MUC5B en els mecanismes de defensa en relació amb la

infecció del tracte respiratori evidenciat en un model experimental murí (36). En la fibrosi pulmonar idiopàtica un polimorfisme de MUC5B s'ha associat una major càrrega bacteriana i major risc de mort (97) i en les bronquièctasis no – fibrosi quística un treball ha mostrat nivells més alts de MUC 2 en l'esput aquells individus amb colonització bacteriana (98).

En l'actual tesi s'ha evidenciat que l'expressió disminuïda de la mucina 2 a la via aèria s'associa a la colonització bacteriana bronquial. Una explicació d'aquesta associació podria ser que la diferent composició de les mucines a la via aèria alterés la viscositat del moc, fent que aquest no dugués a terme la seva funció de barrera per evitar l'adhesió de les bactèries a l'epiteli respiratori i, per altra banda, que hi hagués una alteració del correcte aclariment d'aquest moc juntament amb les partícules nocives que afavorís la permanència de les bactèries a la via aèria. Una altra explicació, seria que la MUC 2 podria jugar un paper en la patogènesi de la colonització bronquial i que la seva disminució en individus amb MPOC els predisposés a la colonització per BPP, tot i que en base al present estudi no es pot establir una relació de causalitat.

Els factors que regulen l'expressió i secreció de les mucines a la via aèria no són del tot coneguts, i podrien ser una de les claus per poder entendre aquestes alteracions i associacions entre mucines, MPOC i colonització. Alguns estudis previs han evidenciat que hi ha certs components bacterians així com citocines inflamatòries que regulen la secreció de les mucines a la via aèria (99,100). El grup de Fujisawa *et al.* (101), van evidenciar mitjançant cultius de cèl·lules epitelials bronquials humanes que l'expressió de les mucines era estimulada per les citocines inflamatòries, de manera dosi i temps dependent. Van demostrar que en presència de citocines inflamatòries s'augmentava l'expressió de les mucines secretores però que la persistència o la intensitat elevada de l'estímul inflamatori inhibia la inducció de mucines.

En aquesta tesi es va evidenciar una relació inversa entre els nivells de IL-6 a la via aèria i els nivells de mucina 2, posant de manifest que la producció de mucines es pot veure alterada en certes condicions de major intensitat i durada de l'estímul inflamatori a la via aèria, en concordança amb el descrit en l'estudi

de Fujisawa *et al.* En la tesi es van valorar altres factors que poguessin influir en la secreció de mucines, com són la càrrega bacteriana a la via aèria i el tabaquisme actiu, però no es van detectar diferències.

Pel que fa a l'alfa-1-defensina es van detectar en l'esput valors més elevats en els subjectes amb colonització bacteriana respecte els no colonitzats. En la literatura ja s'havia detectat que en certes condicions la secreció de PAMs estava alterada, en un estudi es va observar que les beta-defensines estaven disminuïdes en individus fumadors o ex-fumadors amb pneumònia (43). Malgrat això en altres estudis s'ha evidenciat un comportament diferent entre els distints tipus de PAMs, s'ha observat que la seva secreció es pot veure alterada en diferents patologies respiratòries i en context d'inflamació i per altra banda per si mateixos podrien contribuir com a mediadors inflamatoris (44).

En el nostre estudi es va detectar que aquells subjectes amb colonització tenien un ratio més elevat d'exacerbacions en el darrer any, quan es comparava amb els subjectes sense colonització de la via aèria i que resultava estadísticament significatiu. De les troballes realitzades arrel de l'actual tesi, aquells individus susceptibles d'exacerbacions freqüents, serien aquells amb colonització, un menor nivell de mucines i una major inflamació de la via aèria.

La proporció de pacients colonitzats detectada en aquesta tesi (un 31%) es correlaciona amb el que ha estat prèviament publicat en la literatura científica on es descriu que des del 30-50% dels pacients amb MPOC estable presenten BPP a la via aèria (78,102,103). Pel que fa als gèrmens aïllats coincideix amb el descrit amb anterioritat i la majoria de bacteries eren patògens adquirits a la comunitat (14).

Un factor limitant del nostre estudi és que no es va realitzar la quantificació de les mucines en la via aèria de subjectes sans, pel que no s'ha pogut valorar comparativament la MUC 2 en subjectes amb i sense patologia respiratòria. Per alta banda no s'ha realitzat un seguiment en els nivells de mucines i l'evolució clínica que han presentat els pacients a posteriori. Això planteja potencials projectes futurs on es podria realitzar un seguiment al llarg del temps dels

pacients mitjançant determinacions seriades de les mucines secretores en l'esperut, per valorar els canvis en els nivells d'aquestes glicoproteïnes i l'evolució clínica, valorant concomitantment la inflamació i la colonització de la via aèria.

Per altra banda, el present projecte de tesi té com a valor afegit que avalua una mucina secretora no estudiada en els treballs previs: la MUC2, que inclou pacients únicament en fase d'estabilitat clínica i que analitza la correlació entre els nivells d'aquestes mucines amb la presència de colonització bronquial, fet que no ha estat estudiat amb anterioritat.

En conclusió, en aquest primer estudi es van avaluar els nivells de les mucines en la via aèria. Es va observar que, en concordança amb el prèviament descrit, hi ha una alteració en la composició de les mucines secretores en el moc del subjectes amb MPOC i que hi podria haver una associació d'aquesta alteració amb el grau d'obstrucció al flux aeri. La mucina amb major representació a la via aèria dels pacients amb MPOC fou la MUC 2. Es va observar que la presència de nivells disminuïts de la mucina secretora MUC 2 s'associava a la presència de colonització bacteriana i a majors nivells d'inflamació bronquial. Pel que fa a la resta de mucines secretores (MUC 5B, MUC 5AC) no es van detectar diferències en els seus nivells en relació a la presència de colonització bacteriana. Aquesta diferència detectada en la MUC 2 suggereix que aquesta podria jugar un paper en la patogènesi de la colonització bacteriana en els pacients amb MPOC greu.

6.2. DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI 2

En el curs de la MPOC la presència de BPP s'ha associat a una major inflamació de la via aèria així com la presència d'un major nombre d'exacerbacions i un major declinar de la funció pulmonar al llarg del temps (17-20,22,104). Així doncs en la pràctica clínica habitual és de gran rellevància poder evidenciar la presència d'aquestes bactèries per poder detectar de forma precoç aquells individus amb major risc de presentar una pitjor evolució. La tècnica que suposa el "gold estàndard" pel diagnòstic de la infecció o colonització bronquial és l'estudi de mostres obtingudes mitjançant endoscòpia ja que recullen material directament de la via aèria distal, però es tracta d'una prova invasiva i de difícil realització a tot el volum de pacients valorats a les consultes pneumològiques (47,81,103). Així doncs a la pràctica clínica habitual la prova més utilitzada és el cultiu d'esput que presenta importants limitacions. En un gran percentatge d'ocasions la mostra no és vàlida per l'anàlisi ja que està contaminada per bactèries comensals de la via aèria superior, en un altre nombre elevat de casos els pacients no són capaços d'expectorar adequadament i finalment el processament de la mostra precisa d'un temps relativament prolongat per obtenir-ne el resultat (46,48). Per tots aquests motius es fa palesa la necessitat de nous sistemes per a l'aproximació en un diagnòstic acurat de colonització bacteriana de forma no invasiva.

Una de les principals eines en l'estudi de les patologies respiratòries és el TACAR que està àmpliament estès en la pràctica clínica habitual. Estudis previs han evidenciat la seva eficàcia en la valoració de diverses patologies infeccioses respiratòries. Però no és conegut si hi ha canvis morfològics en la via aèria o en el parènquima pulmonar en els pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica que es puguin relacionar amb la presència de bactèries a la via aèria (colonització bronquial). Pel que fa a la colonització bacteriana i les troballes radiològiques en el TC hi ha poca informació a la literatura científica.

En un estudi realitzat en 54 pacients amb MPOC es va valorar la correlació entre les troballes radiològiques en la TACAR relacionades amb les bronquièctasis i la freqüència i gravetat de les exacerbacions, el grau

d'inflamació i la presència de colonització bacteriana. Van detectar que els pacients amb bronquièctasis presentaven un nivell superior d'inflamació de la via aèria, que les bronquièctasis en lòbuls inferiors s'associaven amb major colonització bronquial, majors nivells de IL-8 en l'esput i major temps pel recuperació dels símptomes de les exacerbacions, però no es van detectar diferències en la TACAR pel que fa a la freqüència de les exacerbacions (62). Altres estudis han valorat que certes troballes del TC es correlacionaven amb determinades situacions clíniques: la grau de l'emfisema s'associava amb el BODE, el test de la marxa dels 6 minuts (TM6') i el IMC, i amb el nivell de dispnea, mentre que el gruix de la paret bronquial s'associava amb la freqüència de les exacerbacions prèvies i amb la presència de sibilants i tos (64,105), però en cap d'aquests es valorava la presència de colonització bronquial.

En el present projecte de tesi no es van detectar característiques radiològiques diferencials entre els subjectes amb MPOC i colonització bronquial, respecte els no colonitzats. En el grup de colonitzats es va detectar un nombre major de subjectes exacerbadors freqüents respecte el grup de no colonitzats. Tot i aquesta diferència clínica, amb la TACAR no es van poder detectar diferències radiològiques entre els dos grups de subjectes. En un estudi previ de Han *et al.*, el gruix de les parets bronquials es correlacionava amb la freqüència d'exacerbacions, però en el present estudi no hi ha diferències morfològiques en el TACAR pel que fa al gruix de la paret bronquial en la colonització.

El present projecte de tesi té com a punts forts que la presència de colonització bronquial està determinada mitjançant el gold estàndard, és a dir l'obtenció de mostres endobronquials per l'estudi microbiològic. Així l'actual és un estudi pioner en la valoració de la capacitat de la TACAR per identificar la colonització bronquial en individus en fase d'estabilitat clínica, en els qual l'evidència de gèrmens ha estat detectada mitjançant el RP obtingut per broncoscòpia. En altres estudis s'utilitzen tècniques amb majors limitacions per determinar la presència de colonització i que podrien tenir com a efecte la infraestimació dels subjectes amb MPOC que tenen BPP a la via aèria. La principal limitació, és que es tracta d'un estudi amb una mida mostral reduïda (n=45), malgrat això

altres estudis previs que han evidenciat diferències entre els grups estudiats tenien un mida mostral similar (62).

En resum, el TACAR no va detectar patrons radiològics que permetessin diferenciar aquells pacients amb colonització bronquial dels que no presentaven BPP a la via aèria. Com a possible explicació trobem que la TACAR valora canvis estructurals/ morfològics a la via aèria però en els subjectes estudiats la colonització bronquial probablement no genera els canvis a la via aèria necessaris per poder ser detectats per la TACAR. Per aquest motiu es fa palesa la necessitat d'altres tècniques pel diagnòstic no invasiu de la colonització bronquial.

6.3. DISCUSSIÓ DE L'ESTUDI 3

La necessitat de nous mètodes pel diagnòstic precoç de la colonització bacteriana és de primordial importància, com ja s'ha descrit amb anterioritat en aquesta tesi. En aquesta tesi s'ha evidenciat que el nas electrònic és un sistema que permet la diferenciació entre la presència/absència de BPP a la via aèria dels MPOC i que és una tècnica de senzilla aplicació i baix cost.

Alguns estudis han avaluat la capacitat del nas electrònic per detectar la presència de microorganismes causants d'infeccions del tracte respiratori, en tots aquests es posa de manifest la capacitat discriminatòria del nas electrònic pel que fa a la presència d'infecció. Així en un estudi que va analitzar els patrons de COVS de cultius *in vitro* de mostres de la via aèria superior, es va posar de manifest que el nas electrònic era capaç de diferenciar entre les mostres control i les mostres amb bacteris, i també que podia detectar diferències entre diversos patògens (75). Un altre estudi en la via aèria superior va evidenciar que el nas electrònic identificava adequadament, a partir dels patrons de COVs, un 72% dels pacients diagnosticats de sinusitis respecte els que no ho estaven (76). Finalment Hanson *et al.* van estudiar a pacients amb pneumònia associada al ventilador i mitjançant l'anàlisi de l'aire exhalat, el nas electrònic va ser capaç de discriminar aquells subjectes que presentaven pneumònia dels que no (77). En tots aquests estudis es demostra la capacitat del nas electrònic per detectar infecció en el tracte respiratori, però cap estudi previ ha valorat el nas electrònic per detectar colonització bacteriana en pacients amb MPOC estables clínicament. En aquesta tesi s'ha mostrat, seguint la línia del que ha estat descrit amb anterioritat, que el nas electrònic era capaç de diferenciar també els patrons de COVs dels subjectes amb MPOC amb colonització bacteriana respecte aquells sense colonització amb una precisió del 89%. Aquest fet permet detectar un estadi precoç de la presència de BPP a la via aèria i per tant es presenta com una eina diagnòstica de gran valor i no invasiva.

Per altra banda en aquest projecte de tesi el nas electrònic ha mostrat capacitat per detectar diferències en l'aire exhalat dels subjectes amb MPOC respecte

els individus sans. Això està en concordança amb el que s'ha publicat amb anterioritat a la literatura científica; així en un treball realitzat per Dragonieri S. *et al.* l'e-nose permetia diferenciar els subjectes asmàtics dels sans (72), en un altre projecte d'uns altres autors permetia diferenciar els pacients asmàtics, els que presentaven MPOC, els subjectes controls fumadors i els subjectes controls no fumadors, els uns respecte els altres (73).

Les fortaleeses de l'estudi són que s'ha confirmat que una tècnica no invasiva i de fàcil aplicació pot ajudar en la detecció de colonització bacteriana de la via aèria, que s'ha realitzat comparativament amb el "gold estàndard" pel diagnòstic d'infecció (el RP) (81,103). Per altra banda realitzant aquest estudi, permet confirmar que el nas electrònic podria ser fàcilment aplicable en l'àmbit de la Pneumologia donada la facilitat d'ús, poder usar en l'espai d'una consulta i a peu del pacient i pels resultats ràpids que es poden obtenir.

Les limitacions, que es tracta d'una mostra reduïda de pacients, que no es coneix exactament el que genera els diferents COVs que analitza el nas electrònic i que la interpretació dels resultats passa per un sistema d'anàlisi de dades d'elevada complexitat i pel qual s'ha de fer un entrenament previ del nas electrònic amb les mostres abans de dur a terme el cribratge. Per altra banda, el motiu pel qual hi ha diferències en la composició dels COVs de l'aire exhalat en la infecció no es coneix amb exactitud, podria tractar-se de diferents productes secretats per les bactèries de la via aèria o fins i tot la inflamació secundària a aquestes el que generés una empremta olfactiva diferent. Aquesta darrera explicació podria ser aplicable també a la capacitat discriminatòria de l'e-nose entre malaltia i individus sans, tot i que aquesta informació podria ser d'utilitat no era motiu d'estudi en aquesta tesi.

En definitiva, en aquest estudi es va valorar la capacitat del nas electrònic per determinar la presència de BPP la via aèria i la principal troballa va ser que el nas electrònic era capaç de diferenciar els subjectes amb MPOC amb i sense colonització bacteriana.

Així dels nous mètodes diagnòstics avaluats es va observar que la TACAR no permet diferenciar pacients amb i sense colonització però el nas electrònic sí. El per què la TACAR no permet diferenciar individus amb colonització, podria explicar-se perquè la TACAR només detecta canvis morfològics i aquests probablement no apareixen quan només hi ha presència de BPP a la via aèria, sinó que requereixen d'un major impacte de l'acció bacteriana. Per altra banda el nas electrònic en la mateixa situació sí identifica aquesta presència bacteriana, mitjançant l'anàlisi dels COVs de l'aire exhalat. Aquest fet que es podria explicar perquè el nas electrònic detectés canvis més precoços, és a dir canvis funcionals que encara no es poguessin detectar mitjançant l'estudi d'imatge.

7. CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

7.1. CONCLUSIONS DE L'ESTUDI 1

En aquest projecte de tesi s'ha posat de manifest que la mucina secretora més prevalent a la via aèria dels subjectes amb MPOC greu és la MUC 2. S'ha observat que els nivells disminuïts d'aquesta MUC 2 a la avia aèria es relacionen amb la colonització bacteriana bronquial i amb uns valors més elevats d'inflamació, determinats per IL-6. S'ha identificat que a nivells més baixos de MUC 2 hi ha una major gravetat de l'obstrucció al flux aeri (menor FEV1).

Això posa de manifest que el descens de la mucina 2 podria influir en la colonització bacteriana i que aquest descens pot estar condicionat per la inflamació de la via aèria.

7.2. CONCLUSIONS DE L'ESTUDI 2

El TACAR no detecta troballes radiològiques que permetin diferenciar els subjectes amb colonització bacteriana d'aquells que no en tenen. Aquest fet podria venir explicat perquè no hi ha canvis estructurals a la via aèria que es puguin detectar mitjançant TACAR. Així aquesta no seria una bona tècnica no invasiva pel diagnòstic de la colonització bronquial.

7.3. CONCLUSIONS DE L'ESTUDI 3

El patró de COVs generat pel nas electrònic permet diferenciar els pacients amb MPOC que tenen colonització bacteriana de la via aèria i també permet diferenciar els pacients amb MPOC colonitzats i no colonitzats respecte els controls sans.

S'ha observat que l'e-nose té una elevada sensibilitat i especificitat per identificar els malalts amb MPOC amb/sense colonització i els individus lliures de malaltia, motiu pel qual podria ser una eina de gran impacte en la detecció de subjectes colonitzats.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van WC, Zielinski J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 532-55, 2007.
2. Anto JM, Vermeire P, Vestbo J, Sunyer J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 17: 982-94, 2001.
3. Miravittles M, Soler-Cataluna JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, Riesco JA, Trigueros JA, Pinera P, Simon A, Rodriguez-Hermosa JL, Marco E, Lopez D, Coll R, Coll-Fernandez R, Lobo MA, Diez J, Soriano JB, Ancochea J. Spanish guideline for COPD (GesEPOC). Update 2014. *Arch Bronconeumol* 50 Suppl 1: 1-16, 2014.
4. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367: 1747-57, 2006.
5. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, Buist S. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 27: 397-412, 2006.
6. Pena VS, Miravittles M, Gabriel R, Jimenez-Ruiz CA, Villasante C, Masa JF, Viejo JL, Fernandez-Fau L. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest* 118: 981-9, 2000.
7. Sobradillo V, Miravittles M, Jimenez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, Fernandez-Fau L, Villasante C. [Epidemiological study of chronic obstructive pulmonary disease in Spain (IBERPOC): prevalence of chronic respiratory symptoms and airflow limitation]. *Arch Bronconeumol* 35: 159-66, 1999.
8. Ancochea J, Badiola C, Duran-Tauleria E, Garcia RF, Miravittles M, Munoz L, Sobradillo V, Soriano JB. [The EPI-SCAN survey to assess the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in Spanish 40-to-80-year-olds: protocol summary]. *Arch Bronconeumol* 45: 41-7, 2009.
9. Miravittles M, Soriano JB, Garcia-Rio F, Munoz 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* 64: 863-8, 2009.
10. Connors AF, Jr., Dawson NV, Thomas C, Harrell FE, Jr., Desbiens N, Fulkerson WJ, Kussin P, Bellamy P, Goldman L, Knaus WA. Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. The SUPPORT investigators (Study to Understand Prognoses and Preferences for Outcomes and Risks of Treatments). *Am J Respir Crit Care Med* 154: 959-67, 1996.

11. Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB, Vermeire PA, Buist AS, Thun MJ, Connell C, Jemal A, Lee TA, Miravittles M, Aldington S, Beasley R. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 27: 188-207, 2006.
12. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 187: 347-65, 2013.
13. 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* 35: 295-302, 2010.
14. 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* 14: 1015-22, 1999.
15. Riise GC, Ahlstedt S, Larsson S, Enander I, Jones I, Larsson P, Andersson B. Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax* 50: 360-5, 1995.
16. Bresser P, Out TA, van AL, Jansen HM, Lutter R. Airway inflammation in nonobstructive and obstructive chronic bronchitis with chronic haemophilus influenzae airway infection. Comparison with noninfected patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 947-52, 2000.
17. 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* 109: 288-95, 2000.
18. 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* 173: 991-8, 2006.
19. Wilkinson TM, Patel IS, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA. Airway bacterial load and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1090-5, 2003.
20. Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 57: 759-64, 2002.
21. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R, Miller B, Lomas DA, Agusti A, Macnee W, Calverley P, Rennard S, Wouters EF, Wedzicha JA. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 363: 1128-38, 2010.

22. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 359: 2355-65, 2008.
23. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 55: 114-20, 2000.
24. Monso 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* 13: 338-42, 1999.
25. Garcia-Bellmunt L, Sibila O. Mecanismos de defensa pulmonar. 6[2], 15-24. 2013. Ref Type: Generic
26. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barron J, Achotegui V, Pijoan JI, Llorente JL. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 13: 343-8, 1999.
27. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 343: 338-44, 2000.
28. Nicod LP. Pulmonary defence mechanisms. *Respiration* 66: 2-11, 1999.
29. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol* 70: 459-86, 2008.
30. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 86: 245-78, 2006.
31. Henke MO, Renner A, Huber RM, Seeds MC, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B Mucins Are Decreased in Cystic Fibrosis Airway Secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 86-91, 2004.
32. Henke MO, John G, Germann M, Lindemann H, Rubin BK. MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 816-21, 2007.
33. Kirkham S, Kolsum U, Rousseau K, Singh D, Vestbo J, Thornton DJ. MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 1033-9, 2008.
34. Caramori G, Casolari P, Di GC, Saetta M, Baraldo S, Boschetto P, Ito K, Fabbri LM, Barnes PJ, Adcock IM, Cavallese G, Chung KF, Papi A. MUC5AC expression is increased in bronchial submucosal glands of stable COPD patients. *Histopathology* 55: 321-31, 2009.
35. Kirkham S, Sheehan JK, Knight D, Richardson PS, Thornton DJ. Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem J* 361: 537-46, 2002.

36. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, Tuvim MJ, Adachi R, Romo I, Bordt AS, Bowden MG, Sisson JH, Woodruff PG, Thornton DJ, Rousseau K, De la Garza MM, Moghaddam SJ, Karmouty-Quintana H, Blackburn MR, Drouin SM, Davis CW, Terrell KA, Grubb BR, O'Neal WK, Flores SC, Cota-Gomez A, Lozupone CA, Donnelly JM, Watson AM, Hennessy CE, Keith RC, Yang IV, Barthel L, Henson PM, Janssen WJ, Schwartz DA, Boucher RC, Dickey BF, Evans CM. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 505: 412-6, 2014.
37. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 1: 141-50, 2000.
38. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* 84: 553-61, 1989.
39. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 22: 181-215, 2004.
40. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schroder JM. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 714-21, 2000.
41. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 23: 327-33, 2004.
42. Anderson RL, Hiemstra PS, Ward C, Forrest IA, Murphy D, Proud D, Lordan J, Corris PA, Fisher AJ. Antimicrobial peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Eur Respir J* 32: 670-7, 2008.
43. Herr C, Beisswenger C, Hess C, Kandler K, Suttorp N, Welte T, Schroeder JM, Vogelmeier C. Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax* 64: 144-9, 2009.
44. Parameswaran GI, Sethi S, Murphy TF. Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD. *Chest* 140: 611-7, 2011.
45. Miravittles M, Anzueto A. Antibiotics for acute and chronic respiratory infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 188: 1052-7, 2013.
46. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med* 358: 716-27, 2008.
47. Wimberley NW, Bass JB, Jr., Boyd BW, Kirkpatrick MB, Serio RA, Pollock HM. Use of a bronchoscopic protected catheter brush for the diagnosis of pulmonary infections. *Chest* 81: 556-62, 1982.

48. Ballows A, Hauser WJ, Herrman KL. Manual of Clinical Microbiology. 1991. Ref Type: Generic
49. Franquet T. Radiología Básica del Tórax. Capítulo 1, 7-9. 2013. Editorial Temis Medical. Ref Type: Generic
50. Mueller-Mang C. [Classical patterns of interstitial lung diseases]. Radiologe 54: 1159-69, 2014.
51. Franquet T. High-resolution computed tomography (HRCT) of lung infections in non-AIDS immunocompromised patients. Eur Radiol 16: 707-18, 2006.
52. Franquet T. Imaging of pulmonary viral pneumonia. Radiology 260: 18-39, 2011.
53. Kang M, Deoghuria D, Varma S, Gupta D, Bhatia A, Khandelwal N. Role of HRCT in detection and characterization of pulmonary abnormalities in patients with febrile neutropenia. Lung India 30: 124-30, 2013.
54. Versluys AB, Bierings MB, Beek FJ, Boelens JJ, van der Ent CK, de Jong PA. High-resolution CT can differentiate between alloimmune and nonalloimmune lung disease early after hematopoietic cell transplantation. AJR Am J Roentgenol 203: 656-61, 2014.
55. Wijers SC, Boelens JJ, Raphael MF, Beek FJ, de Jong PA. Does high-resolution CT has diagnostic value in patients presenting with respiratory symptoms after hematopoietic stem cell transplantation? Eur J Radiol 80: e536-e543, 2011.
56. Kang EY, Patz EF, Jr., Muller NL. Cytomegalovirus pneumonia in transplant patients: CT findings. J Comput Assist Tomogr 20: 295-9, 1996.
57. McGuinness G, Gruden JF. Viral and Pneumocystis carinii infections of the lung in the immunocompromised host. J Thorac Imaging 14: 25-36, 1999.
58. Yuan Y, Tao XF, Shi YX, Liu SY, Chen JQ. Initial HRCT findings of novel influenza A (H1N1) infection. Influenza Other Respir Viruses 6: e114-e119, 2012.
59. Amorim VB, Rodrigues RS, Barreto MM, Zanetti G, Hochegger B, Marchiori E. Influenza A (H1N1) pneumonia: HRCT findings. J Bras Pneumol 39: 323-9, 2013.
60. Kunihiro Y, Tanaka N, Matsumoto T, Yamamoto N, Matsunaga N. The usefulness of a diagnostic method combining high-resolution CT findings and serum markers for cytomegalovirus pneumonia and pneumocystis pneumonia in non-AIDS patients. Acta Radiol 2014.

61. Kosciuch J, Krenke R, Gorska K, Zukowska M, Maskey-Warzechowska M, Chazan R. Airway dimensions in asthma and COPD in high resolution computed tomography: can we see the difference? *Respir Care* 58: 1335-42, 2013.
62. Patel IS, Vlahos I, Wilkinson TM, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wilks M, Reznick RH, Wedzicha JA. Bronchiectasis, exacerbation indices, and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 400-7, 2004.
63. Kitaguchi Y, Fujimoto K, Kubo K, Honda T. Characteristics of COPD phenotypes classified according to the findings of HRCT. *Respir Med* 100: 1742-52, 2006.
64. Han MK, Bartholmai B, Liu LX, Murray S, Curtis JL, Sciruba FC, Kazerooni EA, Thompson B, Frederick M, Li D, Schwarz M, Limper A, Freeman C, Landreneau RJ, Wise R, Martinez FJ. Clinical significance of radiologic characterizations in COPD. *COPD* 6: 459-67, 2009.
65. Tulek B, Kivrak AS, Ozbek S, Kanat F, Suerdem M. Phenotyping of chronic obstructive pulmonary disease using the modified Bhalla scoring system for high-resolution computed tomography. *Can Respir J* 20: 91-6, 2013.
66. Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, Burch T, Zheng S, Mazzone PJ, Mekhail T, Jennings C, Stoller JK, Pyle J, Duncan J, Dweik RA, Erzurum SC. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1286-91, 2005.
67. Barlett PN, Gardner JW. *Electronic Noses: Principles and Applications*. 1999. Oxford Univ Press, 1999. Ref Type: Generic
68. Dodd G, Bartlett P, Gardner J. Complex sensor systems: odour detection by the sense of smell and by electronic noses. *Biochem Soc Trans* 19: 36-9, 1991.
69. Buszewski B, Keszy M, Ligor T, Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 21: 553-66, 2007.
70. Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MP, Spanevello A, Carratu P, Resta O, Rabe KF, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer* 64: 166-70, 2009.
71. Dragonieri S, van der Schee MP, Massaro T, Schiavulli N, Brinkman P, Pinca A, Carratu P, Spanevello A, Resta O, Musti M, Sterk PJ. An electronic nose distinguishes exhaled breath of patients with Malignant Pleural Mesothelioma from controls. *Lung Cancer* 75: 326-31, 2012.
72. Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ, Le CS, Gauw SA, Spanevello A, Resta O, Willard NP, Vink TJ, Rabe KF, Bel EH, Sterk PJ. An electronic

- nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J Allergy Clin Immunol* 120: 856-62, 2007.
73. Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, de Nijs SB, Dijkers E, Roldaan AC, Cheung D, Bel EH, Sterk PJ. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 1076-82, 2009.
 74. Valera J.L, Sibila O., Merino J.L, Fiorentino F, Ríos V, López Zamora M, Cosío B, Agustí A. Utilidad de una nariz electrónica en el diagnóstico de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. 46, 128-134. 2010. *Arch Bronconeumol*.
 75. Lai SY, Deffenderfer OF, Hanson W, Phillips MP, Thaler ER. Identification of upper respiratory bacterial pathogens with the electronic nose. *Laryngoscope* 112: 975-9, 2002.
 76. Thaler ER, Hanson CW. Use of an electronic nose to diagnose bacterial sinusitis. *Am J Rhinol* 20: 170-2, 2006.
 77. Hanson CW, III, Thaler ER. Electronic nose prediction of a clinical pneumonia score: biosensors and microbes. *Anesthesiology* 102: 63-8, 2005.
 78. Monso E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J, Ausina V. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 1316-20, 1995.
 79. Sanchis J, Casan P, Castillo J. Normativa para la práctica de la espirometría forzada. *Arch Bronconeumol* 25, 132-142. 1989. Ref Type: Generic
 80. Roca J, Sanchis J, gusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, Casan P, Sans S. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 22: 217-24, 1986.
 81. Soler N, Agusti C, Angrill J, Puig De la BJ, Torres A. Bronchoscopic validation of the significance of sputum purulence in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 62: 29-35, 2007.
 82. Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig De la BJ, Xaubet A, Gonzalez J, Agusti C, Soler N. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur Respir J* 10: 1137-44, 1997.
 83. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl* 37: 1s-2s, 2002.

84. British Thoracic Society guidelines on diagnostic flexible bronchoscopy. *Thorax* 56 Suppl 1: i1-21, 2001.
85. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 187: 347-65, 2013.
86. Müller NL, Franquet T, Lee KS. Imaging of Pulmonary Infections. In: Lippincott Williams & Wilkins, ed. *Imaging of Pulmonary Infections*. Philadelphia, PA 19106 USA.: 2007.
87. Lynch D. Progress in Imaging COPD, 2004 - 2014. *Journal of the COPD Foundation* 1: 73-82, 2014.
88. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 187: 347-65, 2013.
89. Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1530-5, 1996.
90. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. *Eur Respir J* 8: 1333-8, 1995.
91. Vestbo J, Hogg JC. Convergence of the epidemiology and pathology of COPD. *Thorax* 61: 86-8, 2006.
92. Davies JR, Svitacheva N, Lannefors L, Kornfalt R, Carlstedt I. Identification of MUC5B, MUC5AC and small amounts of MUC2 mucins in cystic fibrosis airway secretions. *Biochem J* 344 Pt 2: 321-30, 1999.
93. Chillappagari S, Preuss J, Licht S, Muller C, Mahavadi P, Sarode G, Vogelmeier C, Guenther A, Nahrlich L, Rubin BK, Henke MO. Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction. *Respir Res* 16: 85, 2015.
94. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, Pierrou S, Lund J, Holgate ST, Davies DE, Delany DJ, Wilson SJ, Djukanovic R. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax* 59: 837-42, 2004.
95. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 135: 505-12, 2009.

96. Teixeira A, David L, Reis CA, Costa J, Sobrinho-Simoes M. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) and type 1 Lewis antigens in cases with and without *Helicobacter pylori* colonization in metaplastic glands of the human stomach. *J Pathol* 197: 37-43, 2002.
97. Molyneux PL, Cox MJ, Willis-Owen SA, Mallia P, Russell KE, Russell AM, Murphy E, Johnston SL, Schwartz DA, Wells AU, Cookson WO, Maher TM, Moffatt MF. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 190: 906-13, 2014.
98. Sibila O, Suarez-Cuartin G, Rodrigo-Troyano A, Fardon TC, Finch S, Mateus EF, Garcia-Bellmunt L, Castillo D, Vidal S, Sanchez-Reus F, Restrepo MI, Chalmers JD. Secreted mucins and airway bacterial colonization in non-CF bronchiectasis. *Respirology* 20: 1082-8, 2015.
99. Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J Biol Chem* 273: 6812-20, 1998.
100. Levine SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Ognibene FP, Shelhamer JH. Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 196-204, 1995.
101. Fujisawa T, Chang MM, Velichko S, Thai P, Hung LY, Huang F, Phuong N, Chen Y, Wu R. NF-kappaB mediates IL-1beta- and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 246-52, 2011.
102. Bandi V, Apicella MA, Mason E, Murphy TF, Siddiqi A, Atmar RL, Greenberg SB. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 2114-9, 2001.
103. Rosell A, Monso E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, Zalacain R, Morera J, Torres A. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 165: 891-7, 2005.
104. Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D. Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD. *Eur Respir J* 23: 685-91, 2004.
105. Grydeland TB, Dirksen A, Coxson HO, Eagan TM, Thorsen E, Pillai SG, Sharma S, Eide GE, Gulsvik A, Bakke PS. Quantitative computed tomography measures of emphysema and airway wall thickness are related to respiratory symptoms. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 353-9, 2010.

9. ANNEXES

9. ANNEXES

9.1. ANNEXE I: PUBLICACIONES ORIGINALES INCLOSES EN LA TESI

- Sibila O, **Garcia-Bellmunt L**, Giner J, Merino JL, Suarez-Cuartin G, Torrego A, Solanes I, Castillo D, Valera JL, Cosio BG, Plaza V, Agusti A. Identification of airway bacterial colonization by an electronic nose in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiratory Medicine*. 2014 Nov;108(11):1608-14.

-Sibila O, **Garcia-Bellmunt L**, Giner J, Rodrigo-Troyano A, Suarez-Cuartin G, Torrego A, Castillo, D, Solanes I, Mateus E, Vidal S, Sanchez-Reus F, Sala E, Cosío B, Restrepo M, Anzueto A, Chalmers J, Plaza V. Airway MUC2 is decreased in severe COPD patients with bacterial colonization. *Annals of the American Thoracic Society*. 2016 Feb 16. [Epub ahead of print]



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rmed



Identification of airway bacterial colonization by an electronic nose in Chronic Obstructive Pulmonary Disease



Oriol Sibila^{a,*}, Laia Garcia-Bellmunt^a, Jordi Giner^a,
Jose Luis Merino^b, Guillermo Suarez-Cuartin^a,
Alfons Torrego^a, Ingrid Solanes^a, Diego Castillo^a,
Jose Luis Valera^c, Borja G. Cosio^c, Vicente Plaza^a,
Alvar Agusti^d

^a Department of Respiratory Medicine, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau), Universitat Autònoma de Barcelona, Department of Medicine, Barcelona Respiratory Network (BRN), Barcelona, Spain

^b RFIC Group, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland

^c Department of Respiratory Medicine, Hospital Son Espases, Palma de Mallorca, CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Spain

^d Thorax Institute, Hospital Clinic, IDIBAPS, Univ Barcelona, FISIB, CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona Respiratory Network (BRN), Barcelona, Spain

Received 22 July 2014; accepted 10 September 2014
Available online 19 September 2014

MESH KEYWORDS

COPD;
Bacterial
colonization;
Inflammation;
Volatile organic
compounds

Summary

Background: Airway bacterial colonization by potentially pathogenic microorganisms occurs in a proportion of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). It increases airway inflammation and influences outcomes negatively. Yet, its diagnosis in clinical practice is not straightforward. The electronic nose is a new non-invasive technology capable of distinguishing volatile organic compound (VOC) breath-prints in exhaled breath. We aim to explore if an electronic nose can reliably discriminate COPD patients with and without airway bacterial colonization.

Methods: We studied 37 clinically stable COPD patients (67.8 ± 5.2 yrs, FEV₁ $41 \pm 10\%$ ref.) and 13 healthy controls (62.8 ± 5.2 yrs, FEV₁ $99 \pm 10\%$ ref.). The presence of potentially pathogenic microorganisms in the airways of COPD patients ($n = 10$, 27%) was determined using quantitative bacterial cultures of protected specimen brush. VOCs breath-prints were analyzed by

* Corresponding author. Servei de Pneumologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/Sant Antoni M. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 556 5964; fax: +34 93 556 5601.

E-mail address: osibila@santpau.cat (O. Sibila).

discriminant analysis on principal component reduction, resulting in cross-validated accuracy values. Area Under Receiver Operating Characteristics (AUROC) was calculated using multiple logistic regression.

Results: Demographic, functional and clinical characteristics were similar in colonized and non-colonized COPD patients but their VOC breath-prints were different (accuracy 89%, AUROC 0.92, $p > 0.0001$). Likewise, VOCs breath-prints from colonized (accuracy 88%, AUROC 0.98, $p < 0.0001$) and non-colonized COPD patients (accuracy 83%, AUROC 0.93, $p < 0.0001$) were also different from controls.

Conclusions: An electronic nose can identify the presence of airway bacterial colonization in clinically stable patients with COPD.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

In about 20–50% of patients with clinically stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), potentially pathogenic microorganisms (PPM) can be isolated from their airway secretions [1,2]. This bacterial colonization is associated with enhanced airway inflammation [3,4] and more frequent and severe episodes of exacerbation [5], both of which can impact the clinical course of the disease negatively and increase mortality [6,7]. A proper identification of these patients may, therefore, be clinically relevant [8].

Sputum culture has well-known limitations to identify the presence of bacterial airway colonization in COPD [4,9]. The gold standard for the diagnosis of distal airway infections is the quantitative culture of protected specimen brush (PSB) [9,10], but its invasiveness limits its use in routine clinical practice. The electronic nose (e-nose) is an emerging non-invasive technology that detects volatile organic compounds (VOCs) in the exhaled gas [11]. It uses an array of sensors that react with different VOCs and generate a specific "breath-print" for each individual. The exhaled gas contains a complex mix of VOCs that are derived from various metabolic and inflammatory pathways in the lung [11,12]. Specific breath-prints of some respiratory diseases have been successfully used for diagnostic screening of lung cancer, malignant pleural mesothelioma, asthma and chronic obstructive pulmonary disease [13–16]. In addition, other studies have demonstrated that the e-nose is also able to identify specific upper respiratory bacterial pathogens from *in vitro* cultures [17], as well as in patients with bacterial sinusitis [18] and ventilator-associated pneumonia [19]. To date, however, no previous study has explored the potential utility of the e-nose to identify bacterial airway colonization in clinically stable COPD patients, but it is conceivable that those with PPM in their airways may have a distinct breath-print profile than those without bacterial colonization. Accordingly, we hypothesized that the use of an e-nose in clinically stable COPD patients will allow identification of patients with PPM in their airways. This pilot study sought to explore this hypothesis.

Methods

Study design and ethics

This is a cross-sectional, descriptive and controlled study that included COPD patients with and without airway

bacterial colonization ($n = 10$ and $n = 27$, respectively), as well as healthy controls ($n = 13$). This sample size is similar to that of previous studies that, using the same e-nose device and methodology used here [13–15], identified significant differences between groups. The study protocol was approved by the institutional review board (IBSP-ENO-2009-21), and all subjects signed their informed consent. ClinicalTrials.gov identifier: NCT01976117.

Participants

The diagnosis of COPD was established according to the GOLD recommendations [20] and the presence airway colonization in COPD patients by PSB (see below). All of them were clinically stable as defined by the absence of an exacerbation that required antibiotic or steroid treatment within 30 days prior to inclusion. Patients receiving treatment with oral steroids or other immunosuppressive agents were excluded. Healthy controls were recruited by advertisements in the hospital.

Clinical and functional characterization

Demographic data, level of current symptoms, number of exacerbations in the previous year, time from last exacerbation, relevant comorbid conditions and current treatments were recorded at inclusion using standardized questionnaires. Spirometry (Datospir-500, Sibelmed SA, Barcelona, Spain) was performed according to the Spanish Respiratory Society (SEPAR) guidelines [21], using the predicted values for Mediterranean populations [22].

Microbiological evaluation

PSB samples were obtained from right medium lobe using a bronchoscope and a sterile disposable microbiological brush (ConMed, New York, NY) in all COPD patients and processed using standard methodology [9]. In short, PSB samples were serially diluted (1:10, 1:100, 1:1000). All microbiological specimens were plated on blood, chocolate, Wilkins-Chalgren and Sabouraud's agar. The cultures were evaluated for growth after 72 h. Bacterial load was considered significant when $\geq 10^2$ colony forming units (CFU)/ml [23]. Specific microorganisms were identified according to standard methods and classified as PPM (*Hemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, Gram negative-bacilli, *Pseudomonas aeruginosa* and

Table 1 Demographic, clinical and functional characteristics of the three groups of subjects studied.

	Colonized COPD patients (n = 10)	Non-colonized COPD patients (n = 27)	Healthy controls (n = 13)
Age (years)	68.1 ± 10.9	67.8 ± 6.9	62.8 ± (5.2)
Gender (M/F)	8/2	20/7	9/4
BMI (Kg/m ²)	26.1 ± (4.0)	24.1 ± (5.5)	26.9 ± (3.1)
FEV ₁ postbronchodilatador (L)	1.04 ± 0.37	1.27 ± 0.32	2.67 ± 0.54
FEV ₁ postbronchodilatador (%) pred	38 ± 8	42 ± 8	99 ± 10
FEV ₁ /FVC	0.39 ± 0.09	0.41 ± 0.08	0.76 ± 0.04
GOLD-grade (II/III/IV)	0/8/2	5/18/4	NA
Current/ex-/never-smoker	4/6/0	9/18/0	5/5/0
Pack-years	43.0 ± 8.3	48.9 ± 13.8	16.5 ± 15.28
ICS use	9 (90%)	27 (100%)	NA
LABA use	10 (100%)	27 (100%)	NA
LAMA use	9 (90%)	25 (92%)	NA
Roflumilast use	1 (10%)	2 (7%)	NA
≥2 exacerbations last year	3 (30%)	4 (15%)	NA
Weeks from last exacerbation	15.0 ± 6.2	20.7 ± 14.5	NA

Values are mean ± standard deviation. BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity; LABA: long acting beta agonists; LAMA: long acting muscarinic agonists; ICS: inhaled corticosteroids; NA: not applicable.

Staphylococcus aureus) or non-PPM (*Streptococcus viridans*, *Candida* spp, *Corynebacterium* spp, and *Staphylococcus epidermidis*) for analysis [24].

Exhaled VOCs measurement by e-nose

To assess VOC profiles by e-nose, exhaled gas was collected as previously described [15,16]. Exhaled gas specimens were obtained before the bronchoscopic procedures in COPD patients. In short, exhaled breath was collected in 10-L Tedlar bags after 3 min of tidal breathing through a Hans Rudolph valve with an inspiratory filter and an expiratory silica reservoir exposed to dry air. All participants

stopped their inhaled medications, stop smoking and food-drink intake at least 12 h before the study. The e-nose device (Cyranose 320[®]; Smith Detections, Pasadena, CA) was then connected to the Tedlar bag for 5 min and changes in the electrical resistance of its 32 organic polymeric composite sensor array generated a breath-print VOC profile in each participant. The measurement is based on a resistance variation in each sensor when exposed to a VOC mixture. The differential responses across the array (resistance shifts) are presented as patterns [13–16].

Data analysis

Breath-print data from COPD patients (colonized and non-colonized) and healthy controls were compared with each other using a pattern-recognition application built in the MATLAB software (v.R2012a). They were represented by logarithmic regression as mono- or bidimensional graphics following previously published algorithms [15,16]. Raw data were first reduced by principal component analysis (PCA) to three principal factors. These PCA factors entered a univariate ANOVA followed by post-hoc least significant difference test. Patient classification, based on these PCA factors, was performed using a linear canonical discriminant analysis, calculated as the one that obtains the better percentage of correctly classified patients. The discriminant function is trained with all minus one subject samples. Then the remaining subject samples are tested. If three or four of those samples are addressed to the true class, we consider the subject as "well classified". That process is repeated for all the available subjects and the percentage of correctly classified patients built. That method is known as "leave-one-out" method [16]. A *p* value of less than 0.05 for the trained discriminant function is considered statistically significant. A Receiver Operating Characteristics (ROC) was generated using the results of the discriminant function and combining all the samples of one subject. The

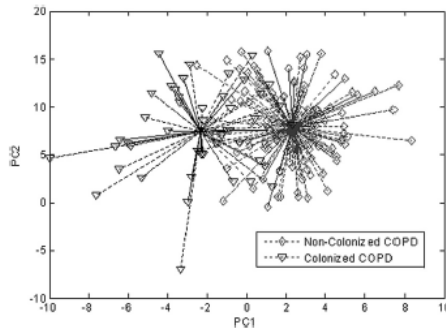


Figure 1 Two-dimensional principal component analyses (PCA) plot showing the discrimination of breath-prints in colonized COPD patients and non-colonized COPD patients (accuracy 89%, *p* < 0.0001). Four samples for each subject are displayed and connected to the class center identifier with scatter lines to improve readability.

Table 2 Receiver operating characteristics analyses of breath-prints between colonized COPD patients, non-colonized COPD patients and healthy controls.

	Colonized vs. non-colonized COPD patients	Colonized COPD patients vs. healthy controls	Non-colonized COPD patients vs. healthy controls
Cross-validation accuracy	89%	88%	83%
Sensitivity	0.82	0.80	0.81
Specificity	0.96	0.93	0.86
AUROC	0.922	0.986	0.937
Positive predictive value	0.87	0.89	0.92
Negative predictive value	0.92	0.87	0.72

AUROC: area under the receiver operating characteristic.

Area Under Receiver Operating Characteristics (AUROC) curve was calculated using multiple logistic regression.

Results

Participant characterization

Thirty-seven patients with stable moderate-severe COPD and 13 healthy controls were included in the study. PSB cultures were positive for PPM in 10 (27%) and negative in 27 (73%) COPD patients; the former were considered colonized and the latter non-colonized. *H. influenzae* was isolated in PSB cultures in 5 patients (50%). *M. catarrhalis* in 2 patients (20%) and *S. pneumoniae*, *E. coli* and *N. meningitidis* in 1 patient (10%).

Table 1 presents the principal characteristics of all participants. Age, sex, Body Mass Index (BMI) and proportion of current smokers was similar in the three groups. Likewise, in patients with COPD, the severity of airflow

limitation (GOLD grade), current treatment and time from last exacerbation were similar in colonized and non-colonized individuals, although there was a non statistically significant trend towards lower FEV₁ values (1.04 L ± 0.37 vs. 1.27 ± 0.37, $p = 0.075$) and higher proportion of frequent exacerbators (≥ 2 exacerbations in the previous year) (30% vs. 15%, $p = 0.6$) in colonized patients.

Breath-print analysis

Breath-prints from colonized vs. non-colonized COPD patients were clearly distinct on visual assessment (Fig. 1). Canonical discriminant analysis showed a cross-validated accuracy of 89% ($p < 0.001$). AUROC curve was 0.92, with a sensitivity of 82% and a specificity of 96% (Table 2, Fig. 2).

Breath-prints corresponding to colonized COPD patients vs. healthy controls and non-colonized COPD patients vs. healthy controls were also fairly distinguishable (Fig. 3), with a cross-validated accuracy of 88% ($p = <0.004$), AUROC of 0.98, sensitivity of 80% and specificity of 93% for the former, and a cross-validated accuracy of 83% ($p = <0.001$), AUROC of 0.93, sensitivity of 81% and specificity of 86% for the latter (Table 2).

When all COPD patients were considered as a single group, irrespective of the presence of bacterial colonization ($n = 37$), COPD breath-prints could also be discriminated from healthy controls with a cross-validated accuracy of 79% ($p < 0.0001$), AUROC of 0.89, sensitivity of 83% and specificity of 76%.

Discussion

The main finding of this study is that an electronic nose can identify accurately the presence of airway colonization by PPM in clinically stable COPD patients.

Previous studies

It is well established that a proportion of clinically stable patients with COPD have bacterial colonization of their lower airways and that this is not innocuous since it is associated with greater levels of inflammation, increased frequency of exacerbations and an accelerate decline of lung function [3–5,25,26]. The diagnosis of airway

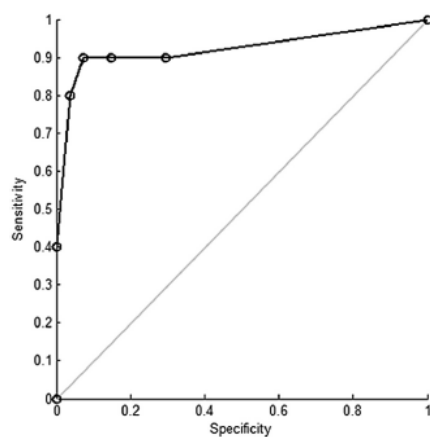


Figure 2 Receiver operating characteristic (ROC) curve of the model predicting the presence of bacterial airway colonization in COPD patients.

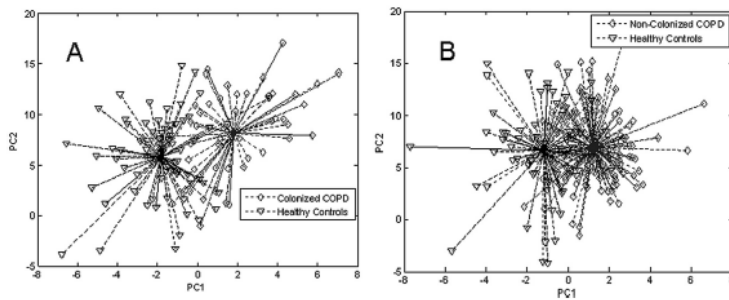


Figure 3 Two-dimensional principal component analyses (PCA) plot showing the discrimination of breath-prints between (A) colonized COPD patients and healthy controls (accuracy 88%, $p < 0.0001$) and (B) non-colonized COPD patients and healthy controls (accuracy 83% $p < 0.0001$) along discriminative composite principal factors. Four samples for each subject are displayed and connected to the class center identifier with scatter lines to improve readability.

bacterial colonization in clinical practice often relies on sputum culture. This method, however, has well known limitations, including the need to produce a valid sputum sample (not a given in many patients), the need for sample processing and the fact that sputum largely reflects processes occurring in the trachea and major bronchi [4,27,28]. Alternatively, the fact that a quantitative culture of PSB, the gold standard for the diagnosis of distal airway infections [9,10], requires bronchoscopy limits its use in the clinic. Hence, a non-invasive, easy to use, cheap and reliable method for the diagnosis of airway colonization by PPM in COPD may be a valuable asset for the management of these patients. Our results suggest that the e-nose may fulfill these requirements.

A few previous studies have used an e-nose to identify micro-organisms causing respiratory tract infections in a variety of different experimental and clinical conditions. Lai et al. demonstrated that the e-nose could distinguish the VOCs patterns of various common respiratory pathogens in culture, including *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, from control swabs [17]. Thaler et al. showed that the e-nose identified correctly the diagnosis of bacterial sinusitis in 72% of the patients [18]. Finally, Hanson et al. reported that the e-nose could effectively identify patients with ventilator-associated pneumonia [19]. Collectively, therefore, these previous observations indicate that the presence of bacteria, both in the upper and lower respiratory tracts, produce a specific breath-print that e-nose may detect. To our knowledge, though, our study is the first to explore its potential utility in identifying the presence of bacterial airway colonization in clinically stable COPD patients.

Interpretation of findings

COPD is associated with an enhanced inflammatory response in the airways and lung parenchyma [20,29] that persist despite smoking cessation [30]. This chronic airway inflammation can cause a specific VOCs breath-print. Supporting this possibility, two previous studies using the same

e-nose we used here were able to discriminate COPD from both asthma (accuracy 96%) and smoker controls (accuracy 66%) [16] as well as COPD from patients with non-small cell lung cancer (accuracy 85%) [13]. Our results confirmed that COPD breath-prints are distinct from healthy controls. More recently Fens et al. reported that exhaled molecular profiles in COPD are closely associated with the types of inflammatory cells present, as well as with their activation status, and suggested that breath analyses may be a novel alternative for the assessment and monitoring of airway inflammation in COPD [31]. Our results provide further support to this possibility since it is well established that the presence of bacterial colonization in some COPD patients is associated with increased airway inflammation [3,4] and our results indicate that the VOCs pattern of COPD patients with bacterial colonization are also different and identifiable using an e-nose. Whether the treatment of these patients with antibiotics influence their clinical course is outside the scope of this study but it clearly is an important area of future research [8].

Strengths and limitations

The major strength of our study is that it tests a novel and non-invasive diagnostic tool (e-nose), using PSB quantitative cultures as the gold standard method for the diagnosis of distal airway infection [9,10], in a population of patients never studied before. Our results confirm, therefore, that e-noses have the potential to be used in respiratory medicine because of their easy and noninvasive use and rapid results [32]. We acknowledge, however, that it has limitations. First, since it was a pilot study that sought to explore the feasibility and potential validity of our working hypothesis, we investigated a relatively small number of patients in a single center so, despite the statistically significant differences between groups observed here, we think that further investigations in larger cohorts of COPD patients in, likely, multicenter studies are warranted to firmly confirm these promising results. Similarly, the ability of the e-nose to identify specific bacterial species will

require further studies. Second, we did not investigate the reproducibility of results. Yet, previous studies using the same methodology and e-nose device showed good reproducibility [14,16,31]. Third, we did not identify the molecular correspondence of the different VOCs [31,33], since this requires the use of gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). It would be of great interest identify which compounds are characteristic of each group in order to confirm these results and detect specific VOCs related to colonized and non-colonized COPD patients. Finally, our data analysis was limited to a discriminant analysis approach. Future studies may use more advanced data analysis techniques, such as Support Vector Machines [34] or Back Propagation Neural Networks [35].

Conclusions

This pilot study shows that the e-nose may be a simple, easy and non-invasive alternative to identify bacterial colonization in COPD patients in clinical practice.

Summary to take home

An electronic nose can identify the presence of airway bacterial colonization in clinically stable patients with COPD.

Conflict of interest

All authors have no conflicts of interest.

Acknowledgments

Funding sources: This research was supported by Spanish Respiratory Society (SEPAR), Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP) and Instituto de Salud Carlos III (FIS PI 12/02628).

References

- [1] Monso E, Ruiz J, Rosell A, et al. 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;152:1316–20.
- [2] Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, et al. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;13:343–8.
- [3] Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, et al. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* 2000;109:288–95.
- [4] Sethi S, Maloney J, Grove L, et al. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:991–8.
- [5] Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, et al. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 2002;57(9):759–64.
- [6] Donaldson GC, Seemungal TAR, Patel IS, et al. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 2005;128(4):1995–2004.
- [7] Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MA, Sánchez R, et al. Severe acute exacerbations and mortality in patients with obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005;60:925–31.
- [8] Miravittles M, Anzueto A. Antibiotics for acute and chronic respiratory infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(9):1052–7.
- [9] Soler N, Agustí C, Angrill J, et al. Bronchoscopic validation of the significance of sputum in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2007;62:29–35.
- [10] Rosell A, Monso E, Soler N, et al. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 2005;165:891–7.
- [11] Moser B, Bodrogi F, Eibl G, et al. Mass spectrometric profile of exhaled breath—field study by PTR-MS. *Respir Physiol Neurobiol* 2005;145(2–3):295–300.
- [12] Buszewski B, Keszy M, Ligor T, et al. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 2007;21(6):553–66.
- [13] Dragonieri S, Annema JT, Schot R, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer* 2009;64(2):166–70.
- [14] Dragonieri S, van der Schee MP, Massaro T, et al. An electronic nose distinguishes exhaled breath of patients with malignant pleural mesothelioma from controls. *Lung Cancer* 2012;75(3):326–31.
- [15] Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:856–62.
- [16] Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, et al. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(11):1076–82.
- [17] Lai S, Deffenderfer BS, Hanson W, et al. Identification of upper respiratory bacterial pathogens with the electronic nose. *Laryngoscope* 2002;112:975–9.
- [18] Thaler ER, Hanson CW. Use of an electronic nose to diagnose bacterial sinusitis. *Am J Rhinol* 2006;20:170–2.
- [19] Hanson CW, Thaler ER. Electronic nose prediction of a clinical pneumonia score: biosensors and microbes. *Anesthesiology* 2005;102:63–8.
- [20] Vestbo J, Hurd S, Agustí A, et al. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. GOLD Executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:347–65.
- [21] Sanchis J, Casan P, Castillo J, et al. Normativa para la práctica de la espirometría forzada. *Arch Bronconeumol* 1989;25:132–42.
- [22] Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, et al. Spirometric reference values from a mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986;22(3):217–24.
- [23] Cabello H, Torres A, Celis R, et al. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease; a bronchoscopic study. *Eur Respir J* 1997;11:137–44.
- [24] Ballows A, Hauser WJ, Hermann KL, et al. *Manual of clinical microbiology*. 5th ed. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1991.
- [25] Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D. Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD. *Eur Respir J* 2004;23:685–91.
- [26] Wilkinson TM, Patel IS, Wilks M, et al. Airway bacterial load and FEV₁ decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1090–5.
- [27] Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008;359:2355–65.
- [28] Ó'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, et al. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax* 2004;59:837–42.

- [29] Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364:709–21.
- [30] Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009;360:2445–54.
- [31] Fens N, de Nijs SB, Peters S, et al. Exhaled air molecular profiling in relation to inflammatory subtype and activity in COPD. *Eur Respir J* 2011;38:1301–9.
- [32] Friedrich MJ. Scientists seek to sniff out diseases: electronic “noses” may someday be diagnostic tools. *JAMA* 2009;301:585–6.
- [33] Ibrahim B, Basanta M, Cadden P, et al. Non-invasive phenotyping using exhaled volatile organic compounds in asthma. *Thorax* 2011;66:804–9.
- [34] Pardo M, Sberveglieri G. Classification of electronic nose data with support vector machines. *Sens Actuators B Chem* 2005;107(2):730–7.
- [35] Kermani B, Schiffman S, Nagle H. Using neural networks and genetic algorithms to enhance performance in an electronic nose. *IEEE Trans Biomed Eng* 1999;46(4):429–39.

Airway MUC2 is Decreased in Severe COPD Patients with Bacterial Colonization

Oriol Sibila^{1,2}, Laia Garcia-Bellmunt^{1,2}, Jordi Giner^{1,2}, Ana Rodrigo-Troyano^{1,2}, Guillermo Suarez-Cuartin^{1,2}, Alfons Torrego^{1,2}, Diego Castillo^{1,2}, Ingrid Solanes^{1,2}, Eder F Mateus^{2,3}, Silvia Vidal^{2,3}, Ferran Sanchez-Reus^{2,4}, Ernest Sala^{5,6}, Borja G Cosio^{5,6}, Marcos I Restrepo⁷, Antonio Anzueto⁷, James D Chalmers⁸, Vicente Plaza^{1,2}

¹Servei de Pneumologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau); ³Laboratori d'Immunologia Experimental, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁵Servei de Pneumologia, Hospital Son Espases-IdISPa, Palma de Mallorca, Spain; ⁶Ciber de Enfermedades Respiratorias (Ciberes), Madrid, Spain; ⁷South Texas Veterans Health Care System and University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX; ⁸Tayside Respiratory Research Group, University of Dundee, Dundee, UK.

Corresponding Author: Dr. Oriol Sibila. Servei de Pneumologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. C/. Sant Antoni M. Claret 167, 08025 Barcelona (Spain). Tel.: +34 93 556 5964; Fax: +34 93 556 5601. E-mail: osibila@santpau.cat

Author Contributions: All authors have given their final approval of the manuscript. OS is the guarantor of the study, he coordinated all the steps including study design, obtaining funding, coordination acquisition of data, and preparation of the manuscript. OS had full access to the data and will vouch for the integrity of the data analysis. LGB contributed to the acquisition, analysis and interpretation of the data and preparation of the manuscript. JF, ART, GSC, DC, and IS contributed to the acquisition, analysis and interpretation of the data. AT, SV, and FSR contributed to the analysis, interpretation of the data and preparation of the manuscript. EFM contributed to the analysis and interpretation of the data. ES and BGC contributed to the design of the study. MIR, AA, and JDC contributed to the interpretation of the data and preparation of the manuscript. VP contributed to the study design, interpretation of the data and preparation of the manuscript.

Word Count: 2749

Key Words: COPD, mucins, airway infection, airway inflammation.

Running Title: Airway MUC2 levels are lower in COPD patients with bacterial colonization.

Conflicts of Interest: All authors have no conflicts of interest

Funding: This research was supported by Sociedad Española de Neumología (SEPAR), Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP) and Instituto de Salud Carlos III (FIS PI 09/2567). Dr. Restrepo's time is partially protected by Award Number K23HL096054 from the National Heart, Lung, and Blood Institute.

Abstract

Rationale: Mucins are essential for airway defense against bacteria. We hypothesized that abnormal secreted airway mucins levels would be associated with bacterial colonization in patients with severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

Objectives: to investigate the relationship between mucins levels and the presence of potentially pathogenic microorganisms in the airways of stable severe COPD patients

Methods: Clinically stable severe COPD patients were examined prospectively. All patients underwent a CT scan, lung function tests, induced sputum collection and bronchoscopy with bronchoalveolar lavage (BAL) and protected specimen brush (PSB). Patients with bronchiectasis were excluded. Secreted mucins (MUC2, MUC5AC and MUC5B) and inflammatory markers were assessed in BAL and sputum using ELISA.

Measurements and Main Results: We enrolled 45 patients, with mean age (SD) of 67 (± 8) years and mean FEV₁ of 41 (± 10) % of predicted value. Thirty one percent (n=14) of patients had potentially pathogenic microorganisms in quantitative bacterial cultures of samples obtained by protected specimen brush. COPD patients with positive cultures had lower levels of MUC2 both in BAL (p=0.02) and in sputum (p=0.01). No differences in MUC5B and MUC5AC levels were observed among groups. Lower MUC2 levels were correlated with lower FEV₁ (r=0.32, p=0.04) and higher sputum IL-6 (r=-0.40, p=0.01).

Conclusions: Airway MUC2 levels are decreased in severe COPD patients colonized by potentially pathogenic microorganisms. These findings may be one of the mechanisms underlying airway colonization in severe COPD patients.

Clinical trial registered with ClinicalTrials.gov (NCT01976117)

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a leading cause of morbidity, mortality and resource use worldwide [1]. Potentially pathogenic microorganisms (PPM) can be isolated from airway secretions in about 30-50% of clinically stable severe COPD patients [2;3]. This bacterial colonization is associated with increased neutrophil mediated airway inflammation [4;5] and more frequent and severe episodes of acute exacerbation of COPD [6]. Therefore, airway bacterial colonization plays an important negative role in the clinical course of the disease [7;8].

Pathogenesis of airway bacterial colonization in COPD is poorly understood. One of the features of COPD is chronic hypersecretion of mucus, which is related to increased risk of airway infection [9;10]. Mucus is composed of water, salt and proteins. The major macromolecular components of the mucus are proteins called mucins [11;12]. Experimental studies have demonstrated that mucin secretion is required for defense against bacterial infections, linking mucin deficiency with chronic airway infections [13].

Several mucins have been described in the lower respiratory tract [14;15], although MUC5AC, MUC5B and MUC2 are the major secreted mucins detected in the airways from healthy individuals [16;17]. In moderate COPD, increases of MUC5AC and MUC5B have been detected compared to non-smokers and smokers without airway obstruction [18;19], although these findings have not been related to airway infection. In non-Cystic Fibrosis (CF) bronchiectasis, elevated MUC2 levels were related to the presence of *Pseudomonas aeruginosa* and severe disease [20]. However, no data regarding the role of mucins and its relationship with airway bacterial infection in COPD is available.

We postulated that mucin levels are protective against airway infection in COPD. Therefore, the aim of our study was to assess the association of airway mucin levels and airway bacterial colonization among patients with severe stable COPD.

Methods

Study Design and Ethics

This is a prospective cross-sectional study that included clinically stable severe COPD patients with and without airway bacterial colonization (n=14 and n=31, respectively). The institutional review board (IIBSP-MUC-200920) approved the study protocol, and all subjects gave signed informed consent to participate in the study (ClinicalTrials. Gov identifier: NCT01976117)

Participants

Patients were consecutively recruited from a specialist clinic at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. The diagnosis of COPD was established according to the GOLD recommendations [1], and included patients with GOLD stages C and D. All participants were clinically stable as defined by the absence of an exacerbation that required antibiotic or steroid treatment within 30 days prior to inclusion. All patients underwent a computerized tomography (CT) scan and those with bronchiectasis, lung cancer, pneumonia and/or interstitial lung diseases were excluded. Patients with active malignant disease and/or any type of immunosuppression were also excluded.

Clinical and Functional Characterization

Demographic data, number of exacerbations in the previous year, time from last exacerbation, relevant comorbid conditions and current treatments were recorded at inclusion using standardized questionnaires. Spirometry (Datospir-600, Sibelmed SA, Barcelona, Spain) was performed according to the Spanish Respiratory Society (SEPAR) guidelines [21], using the predicted values for Mediterranean populations [22].

Microbiological Evaluation

The presence of airway colonization was determined by quantitative microbiological cultures obtained using a protected specimen brush (PSB). PSB samples were obtained from right intermedius bronchus using a flexible bronchoscope and processed using standard methodology. Samples were processed for qualitative and quantitative bacteriology as previously described [23]. Bacterial load was considered significant when it reached $\geq 10^2$ colony forming units (CFU)/ml [24].

Mucins Measurement

BAL samples were recovered using 150 ml saline lavage with the bronchoscope wedged in the right middle lobe. Induced sputum was collected as previously described [25]. Induced sputum was collected just before the bronchoscopy in all patients. BAL and induced sputum were centrifuged at 2000 x g for 10 min at 10°C. Proteases inhibitors (Calbiochem, San Diego, CA, USA) were added to the samples during thawing.

MUC2, MUC5AC and MUC5B were measured by validated commercially available ELISA kits (USCN Life Science Inc., Wuhan, China) as we previously described[20]

Inflammatory Markers

Interleukin (IL)-6 was measured in sputum by ELISA (R & D Systems, Abington, UK). Alpha-1 defensin was also measured in BAL and sputum by ELISA (BlueGene, Shanghai, China)

Statistical Analyses

Statistical analysis was performed using the SPSS 17.0 software program (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Results are presented as mean, standard deviation (SD), standard error (SEM), frequency or percentage, as required. Continuous variables were analyzed using t-student and ANOVA tests, whereas categorical variables were analyzed using χ^2 tests. Mucin levels, airway inflammation, bacterial load, smoking status, tobacco habit (packs/year) and lung function were correlated by linear regression. Non-parametric tests were used when necessary. A p value of <0.05 was considered significant.

Results

Forty-five patients with stable severe COPD were included in the study. Median age (\pm SD) was 67 (\pm 8) years old, and median FEV₁ was 41 (\pm 10) % of predicted value. 37 of them (82%) were male, and 16 (35%) current smokers. Fourteen (31%) stable severe COPD patients had PPM determined by PSB and were considered colonized.

Patient Characteristics

Table 1 shows the characteristics of the subjects, grouped according to the presence or absence of airway bacterial colonization. There were no statistical significant differences in sex, age, smoking status, lung function tests, pre-existing comorbid conditions and prior medications used among groups. COPD patients with bacterial colonization had a higher rate of frequent exacerbations ($p=0.02$) and shorter time from last exacerbation ($p=0.03$)

Microbiology

Table 2 shows the identified PPM and the bacterial load in PSB specimens. The most common pathogen collected from these patients with stable severe COPD were *Haemophilus influenzae* ($n=8$), followed by *Streptococcus pneumoniae* ($n=2$), *Moraxella catarrhalis* ($n=2$), *Neisseria meningitides* ($n=1$) and *Escherichia coli* ($n=1$) respectively. All colonized patients had only one species of PPM in their PSB samples.

BAL Mucin Levels

MUC2 was the secreted mucin with the highest expression in the BAL with a mean (SD) of $8.1 (\pm 4.4)$ ng/ml. MUC5AC levels were $80.3 (\pm 11.2)$ pg/ml and MUC5B levels were $6.4 (\pm 4.0)$ ng/ml.

Stable patients with severe COPD and airway bacterial colonization had lower BAL MUC2 levels compared to those with no airway bacteria colonization (6.3 ± 1.3 vs. 8.9 ± 4.9 ng/ml, $p=0.02$). No differences related to airway bacterial colonization status were observed for BAL MUC5AC levels (80.3 ± 4.3 vs. 80.3 ± 13.0 pg/ml, $p=0.9$) and BAL MUC5B levels (8.8 ± 10.8 vs.

4.2 ± 3.0 ng/ml, p=0.1), respectively. (Figure 1). No differences among BAL mucin levels and type of PPM were found.

Sputum Mucin Levels

MUC2 was also the secreted mucin with highest expression in the sputum with a mean (SD) of 52.4 (± 32.8) ng/ml, followed by MUC5B (12.2 ng/ml [± 14.9]) and MUC5AC (674.2 pg/ml [± 179.1]), respectively. Similar to BAL results, only low sputum MUC2 levels were associated with airway bacterial colonization among stable severe COPD patients (34.7 ± 28.0 vs. 59.9 ± 30.0 ng/ml, p=0.01). There were no differences in sputum MUC5AC levels (304.3 ± 114.4 vs. 360.1 ± 159.1 pg/ml, p=0.5) and sputum MUC5B levels (14.2 ± 10.5 vs. 11.1 ± 6.9 ng/ml, p=0.5) among colonized and non-colonized patients with stable severe COPD. (Figure 2) There were no differences among sputum mucin levels and type of PPM.

A positive correlation was identified among MUC2 (r= 0.34, p=0.03) and MUC5AC (r= 0.14, p=0.02) sputum and BAL mucin samples from stable severe COPD patients.

Inflammatory Markers

Sputum IL-6 and Alpha-1 defensin levels were higher in colonized patients compared with non-colonized patients (1948.5 ± 476.7 vs. 389,1 ± 127.2 ng/ml, p<0,001 and 1244.4 ± 250.2 vs. 498.8 ± 153.6 pg/ml, p=0.01 respectively). BAL Alpha1 defensin levels were also higher in colonized patients, although differences were not statistically significant (143.2 ± 33.2 vs. 101.1 ± 12.2 pg/ml, p=0.2).

Relationship between Mucin Levels and Lung Function and Airway Inflammation

A direct relationship among sputum MUC2 levels and FEV₁ (percent predicted) was found ($r=0.355$, $p=0.04$) (Figure 3A). In addition, there was a significant negative correlation between levels of MUC2 and IL-6 levels in sputum ($r=-0.40$, $p=0.01$) (Figure 3B). We found no other significant correlations among other mucin levels and inflammatory markers, including Alpha-1 defensin. No correlation between mucin levels and airway bacterial load, or smoking status was found.

Discussion

Low levels of airway MUC2 were associated with bacterial colonization and the presence of increased airway inflammation in patients with severe COPD. Although in a cross-sectional study it is not possible to determine whether decreased MUC2 is a cause or a consequence of airway infection, in view of the experimental data published by Roy et al [13], and others, these findings suggest a specific role for MUC2 in the pathogenesis of airway bacterial colonization in severe COPD. No differences in other airway secreted mucins were found.

Mucins are proteins produced by respiratory epithelial cells essential for appropriate airway mucus formation [26;27]. Patients with COPD, especially those with chronic bronchitis, have increased mucus secretion [28]. This mucus hypersecretion has been associated with an accelerated lung function decline and increased risk of exacerbations [9;10;29]. Although it has been speculated that mucus hypersecretion is important in the pathogenesis of COPD, there are few data evaluating mucus properties in these patients. In our study, MUC2 was the

predominant airway secreted mucin both in BAL and in the sputum from severe COPD patients, followed by MUC5B and MUC5AC.

Previous studies in asthma [16], CF [30-32] and chronic bronchitis [33] demonstrated higher levels of MUC5AC, MUC5B rather than MUC2. In COPD, Kirkham et al demonstrated that MUC5B was the major mucin in sputum in moderate COPD patients as compared with smokers without airway obstruction [19]. In this study, sputum with increased amount of MUC5B correlated with lower FEV₁. In our study, lower sputum MUC2 values correlate with lower FEV₁. Caramori et al demonstrated that MUC5AC expression was increased in bronchial submucosal glands of stable moderate COPD patients [18]. Recently, Chillapagary et al showed higher levels of MUC5AC and MUC5B in sputum of moderate to severe COPD during a peri-exacerbation period compared to controls [34].

All of these findings suggested that the expression of airway-secreted mucins are altered in COPD and may be related to disease severity (especially to lung function) and clinical situation (stability or exacerbation). In addition, as has previously been emphasized [35], COPD has a different pathogenesis and different airway inflammatory profile to other chronic airway diseases. Specific role of mucin subtypes and the impact of external stimuli (such as airway infection) in different airway diseases requires further study.

Bacterial colonization plays an important role in the pathogenesis and course of COPD [36]. Chronic airway infection increases airway inflammation and leads to further impairment of local host defense [4;5;37]. Several studies have demonstrated that COPD patients with airway colonization by PPM had worse clinical outcomes [6;10].

The reasons why some COPD patients become colonized are not well established. Mucins have been postulated as natural antimicrobial agents [38]. In the gastrointestinal tract, mucins have demonstrated an antibiotic function against *Helicobacter pylori* [39], but few data are available regarding the relationship between mucins expression and airway infection. Recent experimental studies have demonstrated the crucial role of MUC5B as airway defense mechanism [13].

In idiopathic pulmonary fibrosis, a polymorphism of the MUC5B gene has been associated with increased airway bacterial burden and risk of death [40]. In patients with non-CF bronchiectasis, a recent study showed that stable patients with airway bacterial colonization had higher levels of sputum MUC2, especially those colonized with *P. aeruginosa* [20]. In our study, we found that patients colonized by PPM, primarily by *H. influenzae*, expressed lower levels of airway MUC2 levels in the airway from BAL and sputum samples compared to patients without airway bacterial colonization. These findings may suggest a specific role for MUC2 in the response to bacterial infection that may be airway disease specific and modulated by specific bacterial pathogens. In COPD, the presence of MUC2 might be protective against bacterial colonization, mainly due to *H. influenzae*.

Factors that influence mucin secretion may be a key to understanding these findings. Different studies have demonstrated that mucin secretion is regulated in relation to several factors such as bacterial products [40] and inflammatory cytokines [41]. MUC2 gene is upregulated in vitro by inflammatory mediators present in the airway secretions of patients with chronic lung disease [12]. However, using human bronchial epithelial cells, Fujisawa et al demonstrated that mucin expression is stimulated by inflammatory cytokines in a time- and

dose-dependent manner [42]. These authors showed that the persistence of inflammatory stimulus during time or the presence of excessive inflammation (both features present in most of patients with severe COPD) inhibits mucin induction [42]. These findings are consistent with our study that found that COPD patients with higher airway inflammation (detected by IL-6 levels) were correlated with lower MUC2 levels.

This observation may have important biological consequences, suggesting that those severe COPD patients with elevated and persistent airway inflammation are those with lower MUC2 levels. No relationship among mucin levels and other factors that potentially may influence mucin secretion such as airway bacterial load or current smoking were found. Further studies are needed to interpret this complex pathway that may contribute to better understand the role of secreted mucins as natural antimicrobial agents in the airways of COPD patients.

The strengths of our study include the use of a gold standard bronchoscopic PPM identification with PSB quantitative microbiological cultures [24]. In addition, the careful selection of stable severe COPD patients without bronchiectasis or other structural lung diseases determined by CT scan, strengthen the validity of the results.

Our study also has limitations. First, although our sample size was larger than those previously reported in other studies of airway mucins in COPD [16;19], asthma [16] and CF [30-32] patients, it was still small enough to limit the strength and generalizability of the results. Second, a control group was not included, and it might have informed the normal expression of mucin levels in patients without COPD. Third, we did not assess several other factors that may influence mucin secretion such as specific microbiological properties, pattern recognition receptors, airway cell counts or neutrophil activity. Fourth, previous studies have suggested

concerns about accurate measurements of MUC2 [12], which indicates that some results may be considered with caution. Finally, although the differences we observed were clearly statistically significant, we do not know enough about the biology of specific mucin subtypes in the airway to determine the minimum clinically important difference in airway mucins levels. Further studies correlating mucins levels with clinical outcomes are needed.

In conclusion, we found that airway MUC2 levels are decreased in severe COPD patients with bacterial colonization, which is related with higher airway inflammation. These observations may suggest that secreted mucins play a role in determining the presence of airway bacterial colonization in stable severe COPD. This justifies a larger, more detailed investigation of the role of mucins in airway defense in COPD patients.

References

1. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2013, 187:347-365.
2. Monso E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J, Ausina V: Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1995, 152:1316-1320.
3. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barron J, Achotegui V, Pijoan JI, Llorente JL: Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur.Respir.J.* 1999, 13:343-348.
4. 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.
5. 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.
6. Patel IS, Seemungal TA, 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.
7. Donaldson GC, Seemungal TA, Patel IS, Bhowmik A, Wilkinson TM, Hurst JR, MacCallum PK, Wedzicha JA: Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. 2005. *Chest* 2009, 136:e30.
8. Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Roman SP, Salcedo E, Navarro M, Ochando R: Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005, 60:925-931.
9. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD: The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N.Engl.J.Med.* 2004, 350:2645-2653.
10. Prescott E, Lange P, Vestbo J: Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. *Eur.Respir.J.* 1995, 8:1333-1338.
11. Dekker J, Rossen JW, Buller HA, Einerhand AW: The MUC family: an obituary. *Trends Biochem.Sci.* 2002, 27:126-131.
12. Rose MC, Voynow JA: Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev.* 2006, 86:245-278.
13. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, Tuvim MJ, Adachi R, Romo I, Bordt AS, Bowden

- MG, Sisson JH, Woodruff PG, Thornton DJ, Rousseau K, De la Garza MM, Moghaddam SJ, Karmouty-Quintana H, Blackburn MR, Drouin SM, Davis CW, Terrell KA, Grubb BR, O'Neal WK, Flores SC, Cota-Gomez A, Lozupone CA, Donnelly JM, Watson AM, Hennessy CE, Keith RC, Yang IV, Barthel L, Henson PM, Janssen WJ, Schwartz DA, Boucher RC, Dickey BF, Evans CM: Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2014, 505:412-416.
14. Rose MC, Nickola TJ, Voynow JA: Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2001, 25:533-537.
 15. Thornton DJ, Carlstedt I, Howard M, Devine PL, Price MR, Sheehan JK: Respiratory mucins: identification of core proteins and glycoforms. *Biochem.J.* 1996, 316 (Pt 3):967-975.
 16. Kirkham S, Sheehan JK, Knight D, Richardson PS, Thornton DJ: Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem.J.* 2002, 361:537-546.
 17. Voynow JA, Rubin BK: Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 2009, 135:505-512.
 18. Caramori G, Casolari P, Di GC, Saetta M, Baraldo S, Boschetto P, Ito K, Fabbri LM, Barnes PJ, Adcock IM, Cavallese G, Chung KF, Papi A: MUC5AC expression is increased in bronchial submucosal glands of stable COPD patients. *Histopathology* 2009, 55:321-331.
 19. Kirkham S, Kolsum U, Rousseau K, Singh D, Vestbo J, Thornton DJ: MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2008, 178:1033-1039.
 20. Sibila O, Suarez-Cuartin G, Rodrigo-Troyano A, Fardon TC, Finch S, Mateus EF, Garcia-Bellmunt L, Castillo D, Vidal S, Sanchez-Reus F, Restrepo MI, Chalmers JD: Secreted mucins and airway bacterial colonization in non-CF bronchiectasis. *Respirology.* 2015, 20:1082-1088.
 21. Garcia-Rio F, Calle M, Burgos F, Casan P, Del CF, Galdiz JB, Giner J, Gonzalez-Mangado N, Ortega F, Puente ML: Spirometry. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch.Bronconeumol.* 2013, 49:388-401.
 22. Castellsague J, Burgos F, Sunyer J, Barbera JA, Roca J: Prediction equations for forced spirometry from European origin populations. Barcelona Collaborative Group on Reference Values for Pulmonary Function Testing and the Spanish Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Respir.Med.* 1998, 92:401-407.
 23. Sibila O, Garcia-Bellmunt L, Giner J, Merino JL, Suarez-Cuartin G, Torrego A, Solanes I, Castillo D, Valera JL, Cosio BG, Plaza V, Agusti A: Identification of airway bacterial colonization by an electronic nose in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respir.Med.* 2014, 108:1608-1614.
 24. Soler N, Agusti C, Angrill J, Puig dIB, Torres A: Bronchoscopic validation of the significance of sputum purulence in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2007, 62:29-35.
 25. Vidal S, Bellido-Casado J, Granel C, Crespo A, Plaza V, Juarez C: Flow cytometry analysis of leukocytes in induced sputum from asthmatic patients. *Immunobiology* 2012, 217:692-697.

26. Buisine MP, Devisme L, Copin MC, Durand-Reville M, Gosselin B, Aubert JP, Porchet N: Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1999, 20:209-218.
27. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA: Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu.Rev.Physiol* 2008, 70:459-486.
28. Kim V, Han MK, Vance GB, Make BJ, Newell JD, Hokanson JE, Hersh CP, Stinson D, Silverman EK, Criner GJ: The chronic bronchitic phenotype of COPD: an analysis of the COPDGene Study. *Chest* 2011, 140:626-633.
29. Vestbo J, Prescott E, Lange P: Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1996, 153:1530-1535.
30. Davies JR, Svitacheva N, Lannefors L, Kornfalt R, Carlstedt I: Identification of MUC5B, MUC5AC and small amounts of MUC2 mucins in cystic fibrosis airway secretions. *Biochem.J.* 1999, 344 Pt 2:321-330.
31. Henke MO, Renner A, Huber RM, Seeds MC, Rubin BK: MUC5AC and MUC5B Mucins Are Decreased in Cystic Fibrosis Airway Secretions. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2004, 31:86-91.
32. Henke MO, John G, Germann M, Lindemann H, Rubin BK: MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2007, 175:816-821.
33. Hovenberg HW, Davies JR, Herrmann A, Linden CJ, Carlstedt I: MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconj.J.* 1996, 13:839-847.
34. Chillappagari S, Preuss J, Licht S, Muller C, Mahavadi P, Sarode G, Vogelmeier C, Guenther A, Nahrlich L, Rubin BK, Henke MO: Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction. *Respir.Res.* 2015, 16:85.
35. Postma DS, Reddel HK, Ten Hacken NH, van den Berge M: Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: similarities and differences. *Clin.Chest Med.* 2014, 35:143-156.
36. Sethi S, Murphy TF: Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N.Engl.J.Med.* 2008, 359:2355-2365.
37. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, Pierrou S, Lund J, Holgate ST, Davies DE, Delany DJ, Wilson SJ, Djukanovic R: Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax* 2004, 59:837-842.
38. Voynow JA, Rubin BK: Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 2009, 135:505-512.
39. Molyneaux PL, Cox MJ, Willis-Owen SA, Mallia P, Russell KE, Russell AM, Murphy E, Johnston SL, Schwartz DA, Wells AU, Cookson WO, Maher TM, Moffatt MF: The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2014, 190:906-913.

40. Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB: Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J.Biol.Chem.* 1998, 273:6812-6820.
41. Levine SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Ognibene FP, Shelhamer JH: Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1995, 12:196-204.
42. Fujisawa T, Chang MM, Velichko S, Thai P, Hung LY, Huang F, Phuong N, Chen Y, Wu R: NF-kappaB mediates IL-1beta- and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2011, 45:246-252.

Figure Legends

Figure 1. MUC2, MUC5AC and MUC5B bronchoalveolar lavage (BAL) levels in patients with severe COPD colonized and non-colonized by potentially pathogenic microorganisms. Data is presented as median +/- SEM. *: $p < 0.05$

Figure 2. MUC2, MUC5AC and MUC5B sputum levels in patients with severe COPD colonized and non-colonized by potentially pathogenic microorganisms. Data is presented as median +/- SEM. *: $p < 0.05$

Figure 3. Relationship between (a) MUC2 sputum levels and FEV1 (% of predicted value) and (b) sputum interleukin (IL)-6 levels

Table 1. Patient demographics, clinical characteristics, comorbid conditions and prior treatments among colonized and non-colonized COPD patients.

Variables	Colonized (n=14)	Non-colonized (n=31)	P value
Age, years	68.7 (+/- 10.8)	66.4 (+/- 7.3)	0.07
Male/female	11/3	26/5	0.6
BMI (Kg/m ²)	25.1 (+/- 5.0)	26.0 (+/- 3.9)	0.3
Comorbid conditions			
Smoker/ ex-smoker	5/9	11/20	0.6
Pack-years	59.4 (+/- 24.8)	52.0 (+/- 17.5)	0.3
Chronic cardiac disease	3 (21.4%)	9 (29.0%)	0.5
Prior malignancy	2 (14.3%)	5 (16.1%)	0.8
Chronic kidney disease	0	2 (6.5%)	0.3
Diabetes mellitus	4 (28.6%)	4 (12.9%)	0.2
Hypertension	8 (57.1%)	17 (54.8%)	0.8
Depression	2 (14.3%)	9 (29.0%)	0.2
Stroke	1 (7.1%)	1 (3.2%)	0.5
Functional status			
FEV ₁ (L)	1.1 (+/- 0.31)	1.3 (+/-0.44)	0.1
FEV ₁ (%)	37.2 (+/- 7.8)	43.1 (+/- 10.7)	0.2
Frequent exacerbator *	7 (50.0%)	5 (16.1%)	0.02
Time from last exacerbation, weeks	12.7 (+/- 4.7)	21.8 (+/- 14.4)	0.03
Medications			
ICS	12 (85.7%)	30 (96.8%)	0.1
LABA	14 (100%)	30 (96.8%)	0.4
LAMA	12 (85.7%)	27 (87.0%)	0.8
Roflumilast	1 (7.1%)	2 (6.5%)	0.9

Data are presented as n (%) unless otherwise indicated.

FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity; BMI: body mass index; ICS: inhaled corticosteroids, LABA: long acting beta-agonist.

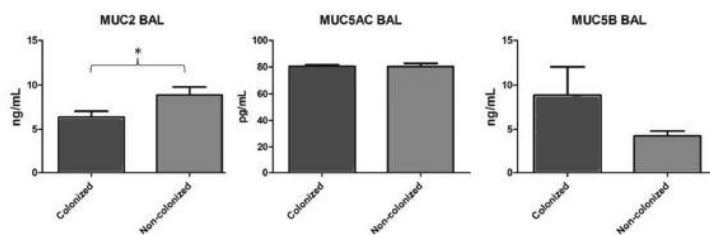
*Frequent exacerbator (≥2 acute exacerbations in the last 12 months)

Table 2. Potentially pathogenic microorganisms and bacterial load isolated in protected specimen brush samples

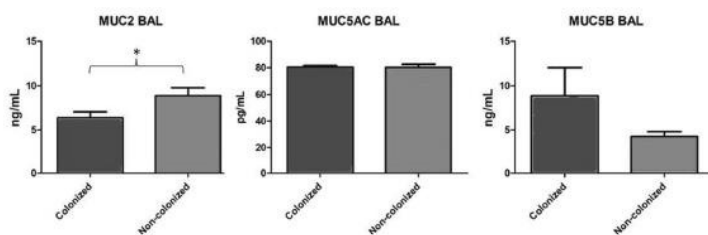
Potentially Pathogenic Microorganisms	n (%)*	$\geq 10^2$ cfu/ml n(%)	$\geq 10^3$ cfu/ml n(%)	$\geq 10^4$ cfu/ml n(%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	8 (57)	1 (12)	7 (88)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2 (14)		1 (50)	1 (50)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2 (14)		2 (100)	
<i>Neisseria meningitidis</i>	1 (7)		1 (100)	
<i>Escherichia coli</i>	1 (7)			1 (100)

CFU, colony-forming units

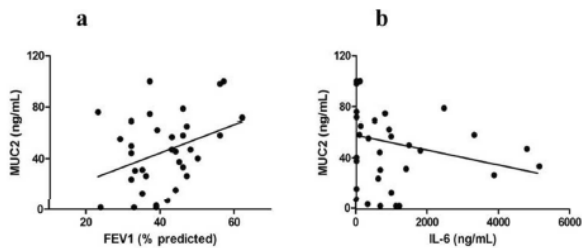
*% refers to the total number of microorganisms



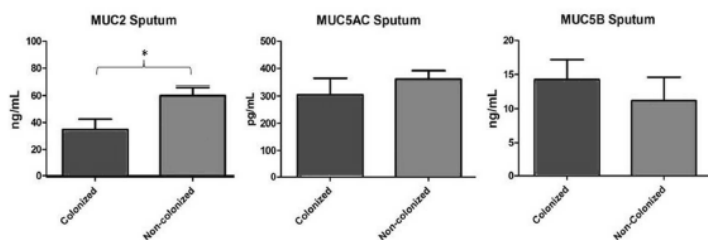
-Figure 1.- MUC2, MUC5AC and MUC5B bronchoalveolar lavage (BAL) levels in patients with severe COPD colonized and non-colonized by potentially pathogenic microorganisms. Data is presented as median +/- SEM. *: $p < 0.05$
254x190mm (96 x 96 DPI)



-Figure 1.- MUC2, MUC5AC and MUC5B bronchoalveolar lavage (BAL) levels in patients with severe COPD colonized and non-colonized by potentially pathogenic microorganisms. Data is presented as median +/- SEM. *: p<0.05
254x190mm (96 x 96 DPI)



-Figure 3.- Relationship between (a) MUC2 sputum levels and FEV1 (% of predicted value) and (b) sputum interleukin (IL)-6 levels
254×190mm (96 × 96 DPI)



-Figure 2.- MUC2, MUC5AC and MUC5B sputum levels in patients with severe COPD colonized and non-colonized by potentially pathogenic microorganisms. Data is presented as median +/- SEM. *: $p < 0.05$ 254x190mm (96 x 96 DPI)