

Asociación entre colonización-infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa* e hiperreactividad bronquial en pacientes con fibrosis quística

José Valverde-Molina^a, Manuel Sánchez-Solís^{b,c}, María Dolores Pastor-Vivero^b y Luis García-Marcos^c

^aUnidad de Neumología Pediátrica. Hospital Los Arcos. Santiago de la Ribera. Murcia. España.

^bUnidad de Neumología Pediátrica. Hospital Virgen de la Arrixaca. El Palmar. Murcia. España.

^cInstituto de Salud Respiratoria. Universidad de Murcia. Murcia. España.

OBJETIVO: La hiperreactividad bronquial (HRB) es un hallazgo común en la fibrosis quística (FQ), que no se ha relacionado de forma concluyente con la atopia. El objetivo del estudio ha sido investigar la relación existente entre la colonización-infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa* y la HRB en un grupo de pacientes con FQ.

PACIENTES Y MÉTODOS: Se realizó la prueba de broncoprovocación inespecífica con histamina a un grupo de 32 pacientes con FQ cuya edad media \pm desviación estándar era de $11,25 \pm 3,7$ años. Además se investigó en estos pacientes la existencia de atopia y colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*.

RESULTADOS: De los 32 pacientes estudiados, se encontró HRB en 9 (28,1%), cuya situación clínica era significativamente peor. Estos 9 pacientes con HRB presentaron todos colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*. Tenían atopia 17 pacientes (53,1%) de la muestra estudiada, pero sólo 3 (33,3%) de los 9 con HRB. La HRB se asoció significativamente con la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa* ($p < 0,001$), pero no con la atopia ($p = 0,12$). Entre los pacientes sin atopia, la colonización se asoció significativamente con HRB ($p = 0,017$). Además, en el grupo de pacientes con función pulmonar normal (volumen espiratorio forzado en el primer segundo $\geq 80\%$) esta asociación fue también significativa ($p = 0,044$), mientras que la asociación entre HRB y atopia no lo fue ($p = 0,11$).

CONCLUSIONES: Los resultados del presente estudio indican que en pacientes con FQ la HRB podría estar relacionada con la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*, que podría ser un factor de riesgo de HRB más importante que la atopia.

Association Between Chronic Colonization or Infection With *Pseudomonas aeruginosa* and Bronchial Hyperreactivity in Patients With Cystic Fibrosis

OBJECTIVE: In patients with cystic fibrosis, bronchial hyperreactivity is a common finding that has not been conclusively associated with atopy. The objective of the present study was to determine the relationship between chronic colonization or infection with *Pseudomonas aeruginosa* and bronchial hyperreactivity in a group of patients with cystic fibrosis.

PATIENTS AND METHODS: A nonspecific histamine bronchial provocation test was administered to a group of 32 cystic fibrosis patients with a mean (SD) age of 11.25 (3.7) years. The presence of atopy and of chronic colonization or infection with *P. aeruginosa* was also studied.

RESULTS: Nine of the 32 patients (28.1%) studied showed bronchial hyperreactivity. The clinical status of these 9 patients was significantly worse and all were colonized or infected with *P. aeruginosa*. Atopy was present in 17 of the 32 patients (53.1%) in the study group, but in only 3 of the 9 patients (33.3%) with bronchial hyperreactivity. Bronchial hyperreactivity was significantly associated with colonization or infection with *P. aeruginosa* ($P < .001$), but not with atopy ($P = .12$). In the patients without atopy, colonization was significantly associated with bronchial hyperreactivity ($P = .017$). In the group with normal lung function (forced expiratory volume in 1 second $\geq 80\%$) this association was also significant ($P = .044$), while the association between bronchial hyperreactivity and atopy was not ($P = .11$).

CONCLUSIONS: The results of the present study suggest that in patients with cystic fibrosis, bronchial hyperreactivity may be associated with colonization or infection with *P. aeruginosa*, and that this may be a more important risk factor for bronchial hyperreactivity than atopy.

Key words: Atopy. Cystic fibrosis. Bronchial hyperreactivity. *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras clave: Atopia. Fibrosis quística. Hiperreactividad bronquial. *Pseudomonas aeruginosa*.

Introducción

La obstrucción bronquial es una alteración fundamental en la fisiopatología de la fibrosis quística (FQ)¹, y la presencia de sibilancias es uno de los hallazgos más

constantes en la auscultación en estos pacientes², que además presentan con frecuencia una respuesta positiva a fármacos broncodilatadores³. Como se recoge en el Registro Europeo de FQ, un elevado número de pacientes tiene síntomas relacionados con el asma, que son mayores cuanto peor es la función pulmonar^{2,4}. La dificultad radica en determinar si estos síntomas se deben a la coexistencia de asma o si, por el contrario, están ocasionados por la propia enfermedad⁵.

Correspondencia: Dr. J. Valverde-Molina.
Servicio de Neumología Pediátrica. Hospital Los Arcos.
P.º de Colón, 54. 30720 Santiago de la Ribera. Murcia. España.
Correo electrónico: jose.valverde@carm.es

Recibido: 10-11-2006; aceptado para su publicación: 27-10-2007.

La hiperreactividad bronquial (HRB), relacionada con la inflamación crónica de la vía aérea y la existencia de alergia, es un hallazgo típico del asma. Ambos factores se encuentran también en los pacientes con FQ. En la fisiopatología de la FQ desempeña un papel importante el binomio inflamación-infección^{1,6}. Estudios recientes indican que la interacción entre infección e inflamación se produce en etapas tempranas de la vida; ambas están relacionadas entre sí y presentes en muchos pacientes en el primer año de vida^{7,8}. Hay una relación directa entre el grado de infección y la intensidad del proceso inflamatorio⁹. A pesar de las similitudes entre la inflamación de la FQ y el asma, hay también ciertas diferencias: el óxido nítrico exhalado se encuentra elevado en el asma, pero no en la FQ¹⁰. Además, los perfiles celulares obtenidos mediante lavado broncoalveolar son diferentes en ambas enfermedades: los linfocitos y eosinófilos están elevados en el asma, mientras que neutrófilos y macrófagos se encuentran más típicamente en la FQ¹¹. Sin embargo, estas últimas células también están elevadas en el asma grave¹². Por otra parte, se ha demostrado un predominio de linfocitos T *helper-2* en sangre de pacientes colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*¹³.

Se ha investigado ampliamente la presencia de HRB en la FQ. Su prevalencia oscila entre el 24 y el 100% dependiendo del método y el criterio de positividad utilizados para la prueba¹⁴. Sin embargo, está aún por establecer cuál es la relación exacta entre la colonización-infección bacteriana y la HRB. El objetivo del presente estudio ha sido analizar la relación entre la HRB y la colonización-infección bacteriana en una población de pacientes con FQ.

Pacientes y métodos

El estudio incluyó a 32 pacientes (19 varones) de entre 6 y 19 años —edad media \pm desviación estándar: 11,25 \pm 3,7 años—, diagnosticados de FQ (prueba del sudor > 60 mmol/l) y con volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) superior al 25% del teórico. Todos eran capaces de realizar una técnica espirométrica correcta, no habían presentado ninguna exacerbación clínica en los últimos 3 meses ni infección respiratoria de las vías altas en las últimas 4 semanas, no presentaban aspergilosis broncopulmonar alérgica y no tomaban fármacos ni sustancias que pudiesen alterar las pruebas de función pulmonar. A todos se les realizó una prueba de broncoprovocación inespecífica administrando histamina a concentraciones crecientes según el método de Cockcroft et al¹⁵ y utilizando el dosímetro Mefar-B3 (Mefar SRL, Bovezzo, Italia). La función pulmonar se midió con un espirómetro Datospir-92 (Sibel SA, Barcelona, España) con especificaciones de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). La prueba de HRB se consideró positiva si hubo una caída del FEV₁ de como mínimo el 20% con una concentración de histamina de 8 mg/dl o inferior.

Además de las variables espirométricas —capacidad vital forzada (FVC), FEV₁, FEV₁/FVC, flujo mesoespiratorio forzado, pico de flujo espiratorio—, en la valoración general de cada paciente se incluyeron: escalas de Chrispin-Norman y Shwachman, existencia de mutación F508del e índice de masa corporal, calculado como puntuación z respecto a estándares de la población española. La atopia se determinó mediante la prueba de punción, en la que se utilizaron los si-

guientes alérgenos: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, epitelios, hongos (*Alternaria* y *Aspergillus*), pólenes —árboles (*Betula*, *Alnus* y *Corylus*), hierbas (*Dactylis*, *Lolium*, *Festuca*, *Poa*, *Phleum*, avena y olivo)—, olivo y parietaria. La prueba se consideró positiva cuando se halló alguna pápula con diámetro máximo de al menos 3 mm, una vez restado el valor negativo. Se interpretó que un paciente estaba colonizado-infectado crónicamente por *P. aeruginosa* cuando se detectó esta bacteria en al menos 3 cultivos de esputo, separados por un mes, en los últimos 6 meses¹⁶, pero no se cuantificó la colonización-infección por *P. aeruginosa*.

Análisis estadístico

Una vez comprobada la normalidad de las variables continuas, se usó la prueba paramétrica de la t de Student para contrastar las diferencias de medias entre los niños con y sin HRB para cada una de dichas variables. Para contrastar la asociación existente entre las variables dicotómicas de interés y la variable HRB se aplicó la prueba exacta de Fisher, ya que no era posible usar el test de la χ^2 porque se incumplía que el 80% de las celdas tuvieran un valor esperado por encima de 5. No fue posible realizar una regresión logística dado que todos los pacientes con HRB estaban colonizados-infectados por *P. aeruginosa*. Por lo tanto, la HRB positiva predice perfectamente la colonización y no es posible construir el modelo de regresión. Para poder excluir los efectos de un mayor tiempo de evolución de la enfermedad y, en consecuencia, una peor función pulmonar, la asociación de atopia y colonización-infección con la HRB se analizó también en el subgrupo de pacientes con función pulmonar normal (FEV₁ \geq 80%). La asociación de colonización-infección e HRB se calculó además en los pacientes no atópicos. Todos estos cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

Resultados

Las características generales de los pacientes se muestran en la tabla I. De los 32 estudiados, sólo en 9 (28,1%) la prueba de HRB fue positiva. Los pacientes

TABLA I
Características generales de los pacientes incluidos en el estudio (n = 32)

Edad media (años)	11,25 \pm 3,7
Sexo: varón/mujer	19/13
IMC (puntuación z)	-0,21 \pm 1,1
Escala Chrispin-Norman	9,31 \pm 1,31
Escala Shwachman	82,34 \pm 15,8
Mutaciones (n = 31)	
F508del/otra	17/31
F508del/F508del	4/31
Otra/otra	10/31
Atopia	17/32
Colonización-infección por <i>P. aeruginosa</i>	17/32
Función pulmonar (% del teórico)	
FVC	88,69 \pm 21,7
FEV ₁	79,13 \pm 26,6
FEV ₁ /FVC	88,44 \pm 11,9
FEF _{25-75%}	55,88 \pm 32,9
PEF	91,94 \pm 31,5
HRB positiva	9/32

Las variables numéricas se expresan como media \pm desviación estándar. FEF_{25-75%}: flujo mesoespiratorio forzado; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; HRB: hiperreactividad bronquial; IMC: índice de masa corporal; PEF: pico de flujo espiratorio.

TABLA II
Características de los pacientes según la hiperreactividad bronquial (HRB)

	HRB		p
	Positiva (n = 9)	Negativa (n = 23)	
Edad media (años)	13,4 ± 4,4	10,4 ± 3,2	< 0,05
Sexo: varón	5/9	14/23	0,78
IMC (puntuación z)	-0,66 ± 0,8	-0,10 ± 1,1	0,25
Escala Chrispin-Norman	14,7 ± 7,8	7,2 ± 6,2	< 0,01
Escala Shwachman	67,7 ± 18,4	88,1 ± 10,4	< 0,001
Mutación (n = 31)			
F508del/otra	6/8	11/23	0,18
F508del/ F508del	1/8	3/23	0,97
Otra/otra	1/8	9/23	0,16
Colonización-infección por <i>P. aeruginosa</i>	9/9	8/23	0,001
Atopia	3/9	14/23	0,12
Función pulmonar (% del teórico)			
FVC	74,0 ± 25,2	94,4 ± 17,5	0,013
FEV ₁	54,9 ± 26,6	88,6 ± 20,0	0,001
FEV ₁ /FVC	76,7 ± 9,4	93,0 ± 9,4	0,001
FEF _{25-75%}	26,4 ± 18,4	67,4 ± 30,2	0,001
PEF	65,9 ± 26,0	102,1 ± 27,7	0,002

Las variables numéricas se expresan como media ± desviación estándar. FEF_{25-75%}: flujo mesoespiratorio forzado; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; HRB: hiperreactividad bronquial; IMC: índice de masa corporal; PEF: pico de flujo espiratorio.

con HRB tenían significativamente peores escalas clínicas y radiológicas, así como una menor función pulmonar (tabla II).

La totalidad de los pacientes con HRB presentaba colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*. Sin embargo, la prevalencia de atopia entre los pacientes con HRB sólo fue del 33%. Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la HRB y la colonización-infección crónica (p < 0,001), mientras que la asociación entre HRB y atopia no alcanzó la significación estadística (tabla II).

TABLA III
Asociación entre colonización-infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa* e hiperreactividad bronquial (HRB) en pacientes con función pulmonar normal

	HRB		p
	Positiva	Negativa	
Atopia	2/2	6/15	0,11
Colonización-infección por <i>P. aeruginosa</i>	2/2	2/15	0,044

TABLA IV
Asociación entre colonización-infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa* e hiperreactividad bronquial (HRB) en pacientes sin atopia

	HRB		p
	Positiva	Negativa	
Función pulmonar normal	1/5	9/10	0,018
Colonización-infección por <i>P. aeruginosa</i>	4/5	1/10	0,017

Entre los pacientes con función pulmonar normal (n = 17), definida como un FEV₁ igual o mayor del 80%, la HRB se asoció de nuevo a colonización-infección crónica (p = 0,044), pero no con atopia (p = 0,11). En el grupo de pacientes no atópicos se mantenía la asociación entre HRB y colonización-infección crónica (p = 0,017). En este caso hubo además una asociación entre tener una función pulmonar normal y tener una prueba de HRB negativa (tablas III y IV).

Discusión

Los resultados del presente estudio indican que la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa* es, con independencia de la atopia y probablemente del deterioro pulmonar, un factor de riesgo en sí mismo para la HRB medida mediante prueba de broncoprovocación inespecífica con histamina. La prevalencia de HRB entre los pacientes incluidos fue relativamente baja (28,1%) y comparable a las encontradas por Mellis y Levison¹⁷ (24%) y Tobin et al¹⁸ (35%), que figuran entre las menores publicadas. La baja prevalencia hallada en el presente estudio podría deberse, de hecho, a que en la FQ la respuesta a la histamina es peor que la mostrada para otras sustancias como la metacolina¹⁹.

En el presente estudio los pacientes con HRB tenían peores escalas clínicas y radiológicas y menor función pulmonar que aquéllos sin HRB¹⁹⁻²². De acuerdo con Mellis y Levison¹⁷, y probablemente como un efecto del tiempo de evolución de la enfermedad, los pacientes con HRB tienen más edad de forma estadísticamente significativa.

La HRB es un hallazgo típico pero no exclusivo del asma. Debido a la elevada prevalencia de esta enfermedad, es bastante probable que pudieran coexistir FQ y asma en un mismo individuo⁵. Sin embargo, se ha visto que la HRB inespecífica en pacientes con FQ difiere de la existente en pacientes asmáticos. Por un lado, la dosis de histamina necesaria para causar un descenso del 20% del FEV₁ es mayor que en el asma y los pacientes asmáticos responden mejor a broncodilatadores que los pacientes con FQ. Por otra parte, el ejercicio y el suero salino hipertónico pueden provocar una respuesta broncodilatadora en pacientes con FQ debido a la movilización de moco y/o a la inestabilidad de la pared bronquial²³⁻²⁵.

La atopia es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de asma en la infancia y además es frecuente entre la población general. En los pacientes del presente estudio encontramos atopia en un 53,1%, prevalencia más elevada que la hallada en nuestra población general de la misma edad (37%)²⁶. En otras publicaciones ya se ha recogido la existencia de una prevalencia de atopia mayor entre los pacientes con FQ que en la población general^{19,27}. En nuestro estudio no encontramos que la atopia sea un factor de riesgo significativo para la HRB, al igual que algunos trabajos previos^{18,19,21}. En cambio, otros estudios sí encuentran una relación muy significativa entre atopia e HRB en pacientes con FQ^{20,22}.

Aparte de la coexistencia de atopia y/o asma, la presencia de HRB en los pacientes con FQ podría estar

relacionada con el tipo de mutación genética que causa la enfermedad. Esta relación no se ha estudiado en profundidad, pero algunos estudios apuntan la posible asociación de asma en pacientes heterocigóticos para F508del²⁸ y también en sujetos con mutaciones de aminoácido (*missense*) en el gen de la FQ²⁹. Nosotros clasificamos a nuestros pacientes en 3 grupos según la ausencia de F508del, su presencia en homocigosis o en heterocigosis, sin que encontráramos asociación entre estos grupos y la existencia de HRB.

En el presente estudio todos los pacientes con HRB estaban colonizados-infectados por *P. aeruginosa*, incluso aquéllos con función pulmonar normal (tabla III). No se sabe si en los pacientes con FQ la inflamación es anterior a la infección o viceversa, aunque sí sabemos que está ya presente en el primer año de vida⁷. Por razones aún no del todo entendidas, *P. aeruginosa* infecta crónicamente el pulmón de los pacientes con FQ y ocasiona una inflamación neutrofílica permanente en la vía aérea³⁰. La existencia de este tipo de inflamación, que no requiere la existencia de infección concomitante, se encuentra en niños pequeños con sibilancias³¹. Por otra parte, el asma "neutrofílica" es un tipo de asma bien definida en el adulto que se relaciona con una mayor gravedad de la enfermedad³². La vía por la cual los neutrófilos contribuyen a los síntomas de asma no está del todo establecida, pero se ha demostrado que estas células son capaces de producir concentraciones significativas de leucotrienos (LT) C₄, transfiriendo el LTA₄ inestable a células que contienen LTC₄ sintetasa (como las células endoteliales) por medio de un proceso llamado "síntesis transcelular de LT cisteínicos"³³. Por otra parte, el proceso de inflamación crónica de la vía aérea produce un tipo de remodelación caracterizada por hiperplasia sin hipertrofia del músculo liso bronquial³⁴. El incremento del número de células del músculo liso puede ser una explicación adicional para la existencia de HRB en la FQ. Además, debería investigarse cómo la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa* puede afectar al correcto funcionamiento de los receptores muscarínicos, especialmente los receptores M₂, que son importantes para el control de la HRB³⁵.

El presente estudio tiene 2 limitaciones principales, ambas relacionadas con la imposibilidad de aplicar un modelo de regresión logística a los datos. En primer lugar, el número de pacientes es demasiado reducido para construir un modelo lo suficientemente potente en el que la HRB fuese la variable dependiente, y la atopía, la colonización-infección, la edad y la función pulmonar, las variables independientes. En segundo lugar, todos los niños con HRB estaban colonizados-infectados, lo que no nos ha permitido utilizar este factor como variable independiente. Sin embargo, la colonización-infección crónica se asocia significativamente con la HRB en el subgrupo de pacientes sin atopía y en el subgrupo de pacientes con función pulmonar normal. Esto indicaría que la asociación entre HRB y colonización es independiente de la atopía y probablemente de la función pulmonar, aunque se desconoce la secuencia de ambos eventos.

En resumen, los resultados del presente estudio indican que en los pacientes con FQ la HRB podría estar relacionada con la colonización-infección crónica por *P. aeruginosa*, que sería un factor de riesgo más importante que la atopía.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dinwiddie R. Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. *Respiration*. 2000;67:3-8.
2. Navarro J, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Mastella G, et al. Factors associated with poor pulmonary function: cross-sectional analysis of data from the ERCF. *European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis*. *Eur Respir J*. 2001;18:298-305.
3. Halfhide C, Evans H, Couriel J. Inhaled bronchodilators for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;4:CD003428.
4. Koch C, McKenzie SG, Kaplowitz H, Hodson ME, Harms HK, Navarro J, et al. International practice patterns by age and severity of lung disease in cystic fibrosis: data from the Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF). *Pediatr Pulmonol*. 1997;24:147-54.
5. Balfour-Lynn IM, Elborn JS. "CF asthma": what is it and what do we do about it? *Thorax*. 2002;57:742-8.
6. De Rose V. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2002;19:333-40.
7. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martínez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1075-82.
8. Armstrong DS, Grimwood K, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Phelan PD. Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ*. 1995;310:1571-2.
9. Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1995;20:63-70.
10. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Exhaled nitric oxide is not elevated in the inflammatory airways diseases of cystic fibrosis and bronchiectasis. *Eur Respir J*. 1998;12:1290-4.
11. Marguet C, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1533-40.
12. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovic R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:9-16.
13. Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Hoiby N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS*. 2000;108:329-35.
14. Weinberger M. Airways reactivity in patients with CF. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2002;23:77-85.
15. Cockcroft DW, Killian DN, Mellon JJ, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy*. 1977;7:235-43.
16. Cantón R, Cobos N, De Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, et al, en representación del Grupo Español de Consenso del Tratamiento Antimicrobiano en el Paciente con Fibrosis Quística. Tratamiento antimicrobiano frente a la colonización pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* en el paciente con fibrosis quística. *Arch Bronconeumol*. 2005;41 Supl 1:1-25.
17. Mellis CM, Levison H. Bronchial reactivity in cystic fibrosis. *Pediatrics*. 1978;61:446-50.
18. Tobin MJ, Maguire O, Reen D, Tempany E, Fitzgerald MX. Atopy and bronchial reactivity in older patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 1980;35:807-13.
19. Mitchell I, Corey M, Woenne R, Krastins IR, Levison H. Bronchial hyperreactivity in cystic fibrosis and asthma. *J Pediatr*. 1978;93:744-8.
20. Eggleston PA, Rosenstein BJ, Stackhouse CM, Alexander MF. Airway hyperreactivity in cystic fibrosis. Clinical correlates and possible effects on the course of the disease. *Chest*. 1988;94:360-5.
21. Sánchez I, Powell RE, Chernick V. Response to inhaled bronchodilators and nonspecific airway hyperreactivity in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1992;14:52-7.

22. Van Asperen P, Mellis CM, South RT, Simpson SJ. Bronchial reactivity in cystic fibrosis with normal pulmonary function. *Am J Dis Child*. 1981;135:815-9.
23. Macfarlane PI, Heaf D. Changes in airflow obstruction and oxygen saturation in response to exercise and bronchodilators in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1990;8:4-11.
24. Rodwell LT, Anderson SD. Airway responsiveness to hyperosmolar saline challenge in cystic fibrosis: a pilot study. *Pediatr Pulmonol*. 1996;21:282-9.
25. Zach MS, Oberwaldner B, Forche G, Polgar G. Bronchodilators increase airway instability in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1985;131:537-43.
26. García-Marcos L, Castro-Rodríguez JA, Suárez-Varela MM, Garrido JB, Hernández GG, Gimeno AM, et al. A different pattern of risk factors for atopic and non-atopic wheezing in 9-12-year-old children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16:471-7.
27. Warner JO, Kilburn SA. Cystic fibrosis and allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 1996;7:67-9.
28. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, Nordestgaard BG. DeltaF508 heterozygosity in cystic fibrosis and susceptibility to asthma. *Lancet*. 1998;351:1911-3.
29. Lázaro C, De Cid R, Sunyer J, Soriano J, Giménez J, Álvarez M, et al. Missense mutations in the cystic fibrosis gene in adult patients with asthma. *Hum Mutat*. 1999;14:510-9.
30. Bush A, Tiddens H, Silverman M. Clinical implications of inflammation in young children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:S11-S4.
31. Najafi N, Demanet C, Dab I, De Waele M, Malfroot A. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol*. 2003;35:302-8.
32. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology*. 2006;11:54-61.
33. Sala A, Folco G. Neutrophils, endothelial cells, and cysteinyl leukotrienes: a new approach to neutrophil-dependent inflammation? *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283:1003-6.
34. Hays SR, Ferrando RE, Carter R, Wong HH, Woodruff PG. Structural changes to airway smooth muscle in cystic fibrosis. *Thorax*. 2005;60:226-8.
35. Coulson FR, Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther*. 2003;98:59-69.