



Infección bronquial crónica: el problema de *Pseudomonas aeruginosa*

Rafael Cantón*, Ana Fernández Olmos, Elia Gómez G. de la Pedrosa, Rosa del Campo y María Antonia Meseguer

Servicio de Microbiología y CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:
Bronquiectasias
Pseudomonas aeruginosa
Biopelículas
Persistencia
Hipermutación

La colonización patogénica broncopulmonar y las exacerbaciones que se derivan de ella constituyen las causas más importantes del deterioro de la función pulmonar en los pacientes con bronquiectasias. *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* son los patógenos más frecuentes en estos pacientes. El efecto lesivo se produce por el proceso de inflamación local y el círculo vicioso que se desarrolla por el estímulo antigénico, la liberación de mediadores de la inflamación, la presencia de neutrófilos, el aumento del inóculo bacteriano y la liberación de exoproductos bacterianos. Se ha demostrado que *P. aeruginosa* afecta a los pacientes con bronquiectasias con peor calidad de vida, coloniza a los que tienen peor funcionalidad pulmonar y mayor número de tratamientos antimicrobianos. En las bronquiectasias, al igual que en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis quística, *P. aeruginosa* es capaz de colonizar crónicamente la mucosa respiratoria. Debido al nicho ecológico donde se sitúa *P. aeruginosa* y a la multitud de ciclos con antimicrobianos a los que son sometidos estos pacientes es fácil que se desarrollen resistencias a los antimicrobianos, favorecidas por la elevada proporción de variantes hipermutadoras que existen. Asimismo, hay que resaltar la forma natural de crecimiento en biopelículas de *P. aeruginosa* en la superficie mucosa y la contribución que ejerce para su persistencia. El tratamiento antimicrobiano en los pacientes con bronquiectasias con colonización por *P. aeruginosa* ha de basarse en antimicrobianos o asociaciones de éstos que no pierdan actividad al actuar sobre las biopelículas.

© 2011 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Chronic bronchial infection: the problem of *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Keywords:
Bronchiectasis
Pseudomonas aeruginosa
Biofilms
Persistence
Hypermutation

Pathogenic bronchopulmonary colonizations and the exacerbations produced are among the most important causes of reduced pulmonary function in patients with bronchiectasis. The most frequent pathogens in these patients are *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Lesions are produced by the local inflammatory process and the vicious circle developed by antigen stimulation, the release of inflammatory mediators, the presence of neutrophils, the increase of bacterial inoculum and the release of bacterial exoproducts. *P. aeruginosa* has been demonstrated to affect the patients with bronchiectasis and poorest quality of life and to colonize those with the poorest pulmonary function and the highest number of antimicrobial treatments. In bronchiectasis, as in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or cystic fibrosis, *P. aeruginosa* is able to colonize the respiratory mucosa chronically. Due to the ecological niche occupied by *P. aeruginosa* and the multitude of cycles with antimicrobial agents to which these patients are subjected, the development of antimicrobial resistance is highly likely, encouraged by the high proportion of hypermutation variants in existence. Likewise, *P. aeruginosa* naturally grows in the form of biofilms on the mucosal surface, greatly contributing to its persistence. Antimicrobial treatment in patients with bronchiectasis and *P. aeruginosa* colonization should be based on antimicrobial agents, alone or in combination, that do not lose activity when acting on biofilms.

© 2011 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.
Correo electrónico: rcanton.hrc@salud.madrid.org (R. Cantón).

Introducción

En los últimos años se ha producido un interés por los pacientes con bronquiectasias (BQ), se ha debatido el papel que ejercen los microorganismos en el deterioro de su función pulmonar y se han escrito diferentes guías para su manejo clínico y farmacológico^{1,2}. Entre las causas que desencadenan la enfermedad se han señalado las infecciones respiratorias previas durante la infancia, las alteraciones congénitas y diferentes inmunodeficiencias, sin descartar las causas iatrogénicas³. Desde el punto de vista de la patogénesis se ha comprobado que el espacio bronquial en el paciente con BQ es un nicho ecológico ideal para la colonización bacteriana por microorganismos denominados potencialmente patógenos. Éstos son similares a los que se encuentran en el paciente adulto con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y, en cierto modo, en la fibrosis quística (FQ)^{4,5}, persisten a lo largo del tiempo e incrementan su número en las exacerbaciones, y es complejo, por no decir imposible, erradicarlos con el tratamiento convencional oral o intravenoso con antimicrobianos. Aunque es posible encontrar una colonización polimicrobiana, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* son los microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia en los pacientes con BQ⁶. Este último es el que se asocia con mayor frecuencia con una respuesta inflamatoria local y un deterioro de la función pulmonar. La dificultad para su erradicación una vez que se produce la colonización crónica se debe a su facilidad para el crecimiento en biopelículas, la facilidad para el desarrollo de resistencias y la ausencia de concentraciones adecuadas durante el tratamiento convencional en el espacio bronquial. La administración de antimicrobianos por vía inhalada, solos o en asociación con antimicrobianos por vía oral con actividad antiinflamatoria y efecto deletéreo sobre el sistema de señalización (*quorum sensing*) que favorece la formación de biopelículas, beneficia la mejoría de los pacientes con BQ⁷.

Colonización bronquial crónica en el paciente con bronquiectasias e inflamación

Las BQ con afectación pulmonar localizadas se han relacionado tradicionalmente con infecciones previas durante la infancia (sarampión, tos ferina, tuberculosis y micobacteriosis, e incluso el virus respiratorio sincitial), mientras que las difusas podrían estar relacionadas con causas que generan un deterioro progresivo de la función pulmonar y favorecen una posterior colonización bacteriana, entre ellas la EPOC, las alteraciones congénitas como la discinesia ciliar primaria o la propia FQ, las inmunodeficiencias primarias (hipogammaglobulinemia) o secundarias (leucemia, postrasplante, etc.), las causas iatrogénicas por inhalación de tóxicos o la artritis reumatoide^{3,8}. Recientemente, se ha correlacionado la presencia de BQ difusas con modificaciones en la funcionalidad del CFTR con relación a diferentes mutaciones pero apartadas de las que presentan los pacientes con FQ⁹. No obstante, el proceso por el cual se desencadena el estado bronquiectásico sería consecuencia de un proceso multifactorial que incluiría la alteración de los mecanismos de defensa locales, la liberación de mediadores inflamatorios y la secreción de moco. Con todo ello se favorecería la obstrucción de la vía aérea y la colonización patogénica³.

De especial interés en el paciente con BQ es el proceso inflamatorio bronquial inespecífico a modo de círculo vicioso que se desencadena como consecuencia de la "colonización patogénica" (fig. 1)¹⁰. La respuesta que se genera no obedece a una agresión directa por microorganismos patógenos, sino al aumento del inóculo bacteriano que tiene como fin la eliminación de la colonización. La cinética de la infección se iniciaría en la propia zona bronquiectásica afectada con activación de sistemas Toll, como en el caso de *P. aeruginosa*, liberación de mediadores de la inflamación y reclutamiento masivo de células inflamatorias, esencialmente neutrófilos. También aumentaría el factor de transcripción nuclear NF- κ B, que conduciría al incremento en la síntesis de

mediadores proinflamatorios en las células del epitelio bronquial, incluyendo interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Algunos de ellos (IL-1 β , IL-8 y TNF- α) participarían en el reclutamiento de neutrófilos mediante la coordinación de diferentes compuestos de adhesión de la superficie de las células endoteliales y de los leucocitos (selectinas, integrinas CD/11CD18 e inmunoglobulinas de familias ICAM-1, VCAM-1 y CD47).

La presencia masiva de neutrófilos en la vía aérea desencadena, a su vez, la liberación de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , leucotrieno LTB₄ y prostanooides, y un efecto lesivo directo sobre la mucosa por la liberación de elastasas, proteasas, mieloperoxidasas, catepsina G y productos oxidativos, que ejercerían una proteólisis del epitelio bronquial y una mayor producción de mucina. Con ello, aumenta la viscosidad de las secreciones y se favorece la obstrucción de la vía aérea (fig. 1).

En el paciente con BQ también se ha señalado la alteración de los receptores fagocíticos de los macrófagos, y el aumento de los macrófagos y linfocitos T en la lámina propia y en el epitelio. Los macrófagos contribuirían al reclutamiento de neutrófilos (mediante producción de TNF- α y endotelina) y funcionarían como reguladores (por medio del TNF- α , IL-8, quimiocinas, LTB₄, especies de oxígeno reactivo y enzimas elastolíticas). También los linfocitos T producirían IL-17, citocina igualmente asociada con el reclutamiento y activación de neutrófilos en el espacio broncoalveolar, en particular durante la fase de movilización desde el compartimento vascular.

Esta respuesta inflamatoria exagerada se ve reforzada por la deficiente neutralización de los mediadores antiinflamatorios y menor síntesis de IL-10 (citocina con actividad antiinflamatoria) y óxido nítrico que, a su vez, da lugar a una menor actividad del inhibidor de la proteína κ (IK- β) que actúa como inhibidor de NF- κ B.

Finalmente, el incremento del inóculo bacteriano, la infección viral o por patógenos fúngicos reconocidos, aumentaría aún más el número de células inflamatorias (neutrófilos) produciéndose las exacerbaciones que se manifiestan clínicamente por el aumento del volumen y modificación del color del esputo, que varía del inicialmente mucoso (blanco, con escasos leucocitos) a mucopurulento (verde pálido o amarillo, con moderados leucocitos) y a purulento (verde y con gran contenido de leucocitos).

Pseudomonas aeruginosa: persistencia, hipermutación y resistencia a los antimicrobianos

Los microorganismos que colonizan la vía aérea del paciente con BQ varían según la edad del paciente y su situación clínica. En general, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae* son los que se encuentran con mayor frecuencia^{3,11}, aunque el mayor deterioro de la función pulmonar se ha relacionado con *P. aeruginosa*¹². Con menor frecuencia que los anteriores se han encontrado microorganismos que no forman parte de la microbiota transitoria, entre ellos algunos del género *Noctuidia* spp. (*N. asteroides*), micobacterias no tuberculosas y hongos filamentosos (*Aspergillus fumigatus*)^{11,13}.

El hallazgo de *P. aeruginosa* con morfotipo mucoso en las secreciones respiratorias del paciente con BQ suele asociarse con una colonización crónica. En la práctica, es infrecuente el reconocimiento de la primocolonización puesto que el estudio microbiológico suele realizarse cuando el paciente presenta ya un deterioro de la función pulmonar y se produce escasa respuesta al tratamiento, momento en el cual la colonización crónica por *P. aeruginosa* es más frecuente. Asimismo, aunque su aislamiento se relaciona con un aumento de la expectoración y de mediadores de la inflamación en las secreciones respiratorias, hay datos discrepantes sobre su verdadero efecto patógeno^{14,15}. No obstante, la colonización de la mucosa respiratoria en los pacientes con BQ por *P. aeruginosa* se produce generalmente en los pacientes de mayor edad, peor función respiratoria, mayor número de ingresos hospitalarios y cursos de tratamiento antimicrobiano. En algunos de los estudios también se ha observado un mayor número

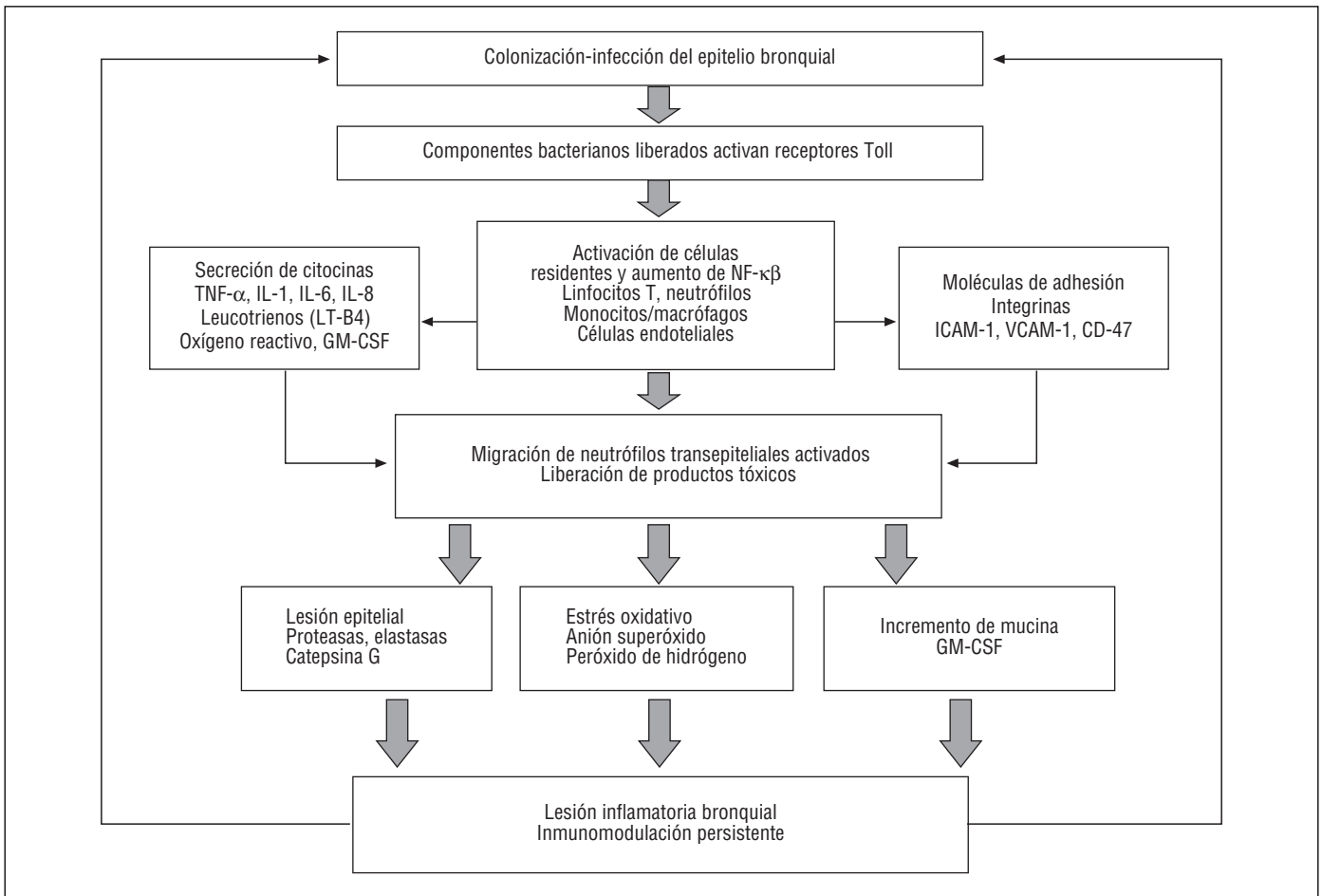


Figura 1. Círculo vicioso de respuesta inflamatoria local y colonización bronquial crónica en los pacientes con bronquiectasias.

ro de exacerbaciones^{6,14,15}. Asimismo, se ha correlacionado claramente con una peor calidad de vida y el deterioro progresivo de la función pulmonar^{16,17}.

En los estudios de seguimiento a largo plazo de pacientes con BQ se ha demostrado el aislamiento persistente de *H. influenzae* o de *P. aeruginosa* en más del 50% de ellos^{8,12}. El análisis por técnicas de microbiología molecular reveló que en el caso de *H. influenzae* es frecuente el aislamiento de diferentes cepas e incluso la colonización simultánea por diferentes clones^{8,18}. En *P. aeruginosa* se ha comprobado la colonización persistente por un único clon, similar a lo que acontece en el paciente con FQ y EPOC, en el que es habitual un patrón de colonización crónico por la misma cepa^{8,12,19}. Al igual que en la FQ, la erradicación de estos patógenos es prácticamente imposible, aunque se ha demostrado que el tratamiento antimicrobiano reduce los recuentos bacterianos y mejora la función respiratoria²⁰.

Similar a lo que sucede en otros pacientes con enfermedad supurativa crónica por *P. aeruginosa*, en el paciente con BQ se produce una adaptación a las condiciones ambientales hostiles. El estado de alta densidad de células bacterianas es comunicado entre las bacterias por moléculas específicas o "autoinductores" que están regulados por un mecanismo conocido como *quórum-sensing*, que controla la formación de biopelículas y algunos de los factores de la virulencia²¹. También el alto inóculo en un nicho en el que se producen modificaciones en la presión de oxígeno, deprivación de nutrientes y estrés medioambiental favorece la selección de mutantes resistentes, sobre todo en las cepas en las que se produzcan procesos de hipermutación²².

La hipermutación es un fenómeno demostrado en las poblaciones de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con BQ, EPOC y FQ que

facilita los fenómenos de adaptación a las condiciones adversas medioambientales y también el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos^{22,23}. El carácter hipermutador en una población bacteriana se produce cuando la tasa de mutación espontánea es significativamente superior a la normal (de 100 a 1.000 veces) y es debido a la alteración de genes que participan en el sistema de edición durante la replicación del ADN (sistemas de reparación "mismatch" o MMR). El proceso de intensa adaptación genética por la acumulación de múltiples mutaciones favorece la persistencia a largo tiempo con alta resistencia a los antibióticos. También favorecería la adaptación a la respuesta del sistema inmune. Desde el punto de vista del tratamiento antimicrobiano, la consecuencia inmediata de la hipermutación es el desarrollo progresivo de resistencias a los antimicrobianos. Los mutantes resistentes serían fácilmente seleccionables bajo la acción de los antimicrobianos, sobre todo cuando se producen inóculos bacterianos elevados.

El propio tratamiento antibiótico se considera un factor de estrés que favorece la selección y al aumento de la resistencia a los antimicrobianos, que una vez presente aumentarían la posibilidad de una subsiguiente generación de mutantes resistentes a antibióticos adicionales²⁴. En el caso de *P. aeruginosa* se generan fácilmente mutantes que son resistentes a las concentraciones clínicas de los antimicrobianos antipseudomónicos utilizados habitualmente²⁵. Se ha descrito la elevada frecuencia (43%) de cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras en los pacientes con FQ, siendo incluso mayor (53%) en los pacientes con BQ crónicas^{22,26}. En estos aislados se ha observado mayor porcentaje de cepas resistentes y resistencia múltiple cuando las cepas son hipermutadoras (fig. 2).

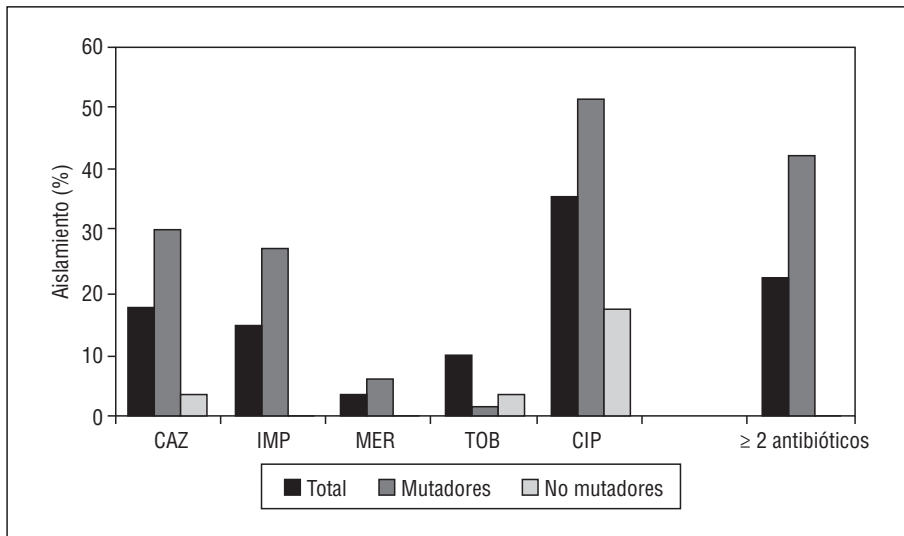


Figura 2. Resistencia a los antimicrobianos en *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica no asociados a fibrosis quística. Se indican los porcentajes totales para diferentes antibióticos y para 2 o más antibióticos en cepas mutadoras y no mutadoras. CAZ: ceftazidima; IMP: imipenem; MER: meropenem; TOB: tobramicina; CIP: ciprofloxacino.

Asimismo, el proceso de intensa adaptación genética dirigido por la acumulación de múltiples mutaciones favorece la persistencia a largo tiempo. Sin embargo, como consecuencia, *P. aeruginosa* sufre un coste biológico disminuyendo su fitness y virulencia²⁷, situación que podría también estar favorecida por el crecimiento en biopelículas²⁸.

***Pseudomonas aeruginosa*: formación de biopelículas y actividad de antimicrobianos**

El crecimiento en biopelículas de los microorganismos ha sido ampliamente estudiado durante las últimas décadas y, en particular, en *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con infección broncopulmonar supurativa crónica. En general, el componente mayoritario de las biopelículas es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y células bacterianas, la matriz de las biopelículas es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias²⁹. Entre estas últimas destacan los ramnolípidos, moléculas surfactantes producidas por *P. aeruginosa* que desempeñan un papel en el mantenimiento de canales en la estructura de la biopelícula y que confieren una estructura con forma de seta³⁰. En contra de lo inicialmente establecido, se ha demostrado que la arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida y que presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas. Su existencia no evita, sin embargo, que dentro de su estructura se produzcan distintos ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente y en el que es fácil la diversificación³¹.

La etapa inicial del proceso de formación de biopelículas es la adherencia sobre una superficie; en el caso de las BQ, la mucosa bronquiectásica afectada. Una vez que se produce la adherencia, comienza la división bacteriana y se extienden formando microcolonias. En una etapa posterior se secreta un exopolisacárido, matriz de la biopelícula, y forma unas estructuras similares a setas entre las cuales se observan canales. Algunas de las bacterias de la matriz pueden liberarse y colonizar nuevas superficies, aumentando las dificultades para su eliminación³². El proceso de formación y estabilidad de las biopelículas está regulado por el sistema de *quorum sensing*.

Las biopelículas confieren una resistencia de las bacterias a la acción de los antimicrobianos. En las infecciones agudas, las bacterias pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, mientras que en las infecciones asociadas a biopelículas no se consigue por completo la erradicación y se producen episodios recurrentes. La pro-

pia estructura de la biopelícula y las características fisiológicas de los microorganismos que la forman (poblaciones heterogéneas con baja actividad metabólica) confieren un mecanismo de defensa a la acción de los antimicrobianos^{32,33}. Esta resistencia se produce por varios hechos diferentes: a) la barrera de difusión física y química, y resistencia a la penetración de los antimicrobianos a través de la matriz de exopolisacáridos de la biopelícula; b) el lento crecimiento de las bacterias en las biopelículas debido a la limitación de nutrientes, y c) la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de fenotipos hipermutadores que favorece el desarrollo de mutantes resistentes²⁸. Además, el crecimiento en biopelículas hace que a largo plazo se produzca una estabilización de los morfotipos y fenotipos de resistencia a los antimicrobianos.

Entre todas estas razones, la más intuitiva que podría explicar la resistencia a los antimicrobianos es la incapacidad del antibiótico para penetrar en la biopelícula a través de la matriz de exopolisacáridos y ejercer su efecto inhibitorio o letal sobre las bacterias que componen esta estructura. Las sustancias poliméricas extracelulares en la matriz actúan como barrera para estas moléculas e influyen en el transporte al interior de la biopelícula. Asimismo, la capa de alginato de las cepas mucosas de *P. aeruginosa* parece prevenir contra los anticuerpos y bloquea los determinantes inmunológicos requeridos para la fagocitosis opsónica, por lo que se dificulta la acción de los antimicrobianos. Respecto a la alteración de la tasa de crecimiento de los microorganismos en las biopelículas se ha observado que crecen considerablemente más lentos que en las células planctónicas, por lo que se dificulta la acción de los antimicrobianos.

Actualmente, con los modelos in vitro se ha demostrado una pérdida de actividad de algunos antimicrobianos antipseudomónicos cuando *P. aeruginosa* está creciendo en biopelículas (tabla 1)³⁴. Este hecho se produce de manera importante con los antibióticos beta-lactámicos, pero no afecta a otros como las fluoroquinolonas (levofloxacino y ciprofloxacino), los aminoglucósidos (tobramicina) y la colistina. Asimismo, se ha comprobado que la azitromicina, que carece de efecto antimicrobiano en bacterias planctónicas (en medios líquidos no adheridos a superficies), presenta actividad antimicrobiana sobre bacterias sésiles además de su interferencia con los sistemas de señalización o *quorum sensing* que modula formación de la biopelícula³⁵.

También se ha constatado con técnicas de microscopía confocal y colorantes vitales, que no todos los antimicrobianos son activos de igual forma sobre las bacterias en crecimiento en biopelículas. La tobramicina y el ciprofloxacino actúan sobre las células metabólicamente más activas que se sitúan sobre la superficie de la biopelícula y

Tabla 1Valores de concentración mínima inhibitoria en *Pseudomonas aeruginosa* con crecimiento planctónico (CMI) y en biopelículas (crecimiento sésil) (BIC)

| Antibiótico | CMI ^a (mg/l) | | BIC ^b (mg/l) | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|
| | Rango | MIC ₅₀ | Rango | CMI ₅₀ |
| Piperacilina-tazobactam | ≤ 1-1,024 | 4 | ≤ 16-> 512 | 256 |
| Ceftazidima | ≤ 2-512 | 2 | ≤ 2-> 128 | 128 |
| Meropenem | ≤ 1-16 | ≤ 1 | ≤ 1-> 64 | 64 |
| Ciprofloxacino | ≤ 0,25-16 | 1 | ≤ 0,25-> 16 | 4 |
| Tobramicina | ≤ 0,25-> 512 | 2 | ≤ 1-> 64 | 4 |
| Colistina | ≤ 0,5-8 | ≤ 0,5 | 8-> 128 | 128 |
| Azitromicina | NA | NA | ≤ 0,5-> 32 | 2 |

^aConcentración mínima inhibitoria.^bConcentración mínima inhibitoria en biopelículas.Tomada de Moskowitz et al³⁴.

que son responsables de la diseminación a nuevos lugares de colonización. Por el contrario, la colistina es más activa sobre células metabólicamente más inactivas, que están en la parte central de la biopelícula y que son responsables de la persistencia de ésta³⁶. Es importante el conocimiento de estas diferencias para establecer el tipo de tratamiento antimicrobiano y las posibles asociaciones que puedan beneficiar a los pacientes con BQ.

Conclusiones

P. aeruginosa es uno de los patógenos más importantes en el paciente con BQ y el que se asocia con mayor deterioro de la función pulmonar. Durante la colonización patogénica por este microorganismo se produce un círculo vicioso en el que la inflamación local ejerce un efecto lesivo importante sobre la mucosa respiratoria que genera una pérdida de funcionalidad respiratoria. La dificultad del tratamiento y erradicación de *P. aeruginosa* de la mucosa respiratoria en los pacientes con BQ se debe a su facilidad para desarrollar resistencias, favorecida por los procesos de hipermutación, al crecimiento en biopelículas. Deben emplearse antibióticos que tengan escaso poder de selección de poblaciones resistentes y con actividad sobre bacterias en crecimiento en biopelículas.

Conflicto de intereses

A. Fernández Olmos tiene un contrato del programa Río Hortega de formación en investigación para profesionales con formación superior especializada del Instituto de Salud (CM08/166). R. del Campo tiene un contrato de investigación del Instituto de Salud Carlos III (CB05/137). El resto de autores declara no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Vendrell M, De Gracia J, Olveira C, Martínez MA, Girón R, Máz L, et al. Diagnóstico y tratamiento de las bronquiectasias. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Arch Bronconeumol. 2008;44:629-40.
- Pasteur MC, Bilton D, Hill AT; British Thoracic Society Bronchiectasis non-CF Guideline Group. British Thoracic Society guideline for non-CF bronchiectasis. Thorax. 2010; 65 Suppl 1:i1-58.
- Barker AF. Bronchiectasis. N Engl J Med. 2002;346:1383-93.
- Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev. 2001;14:336-63.
- Cantón R, Cobos N, De Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, et al. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect. 2005; 11:690-703.
- Angrill J, Agustí C, De Celis R, Rano A, González J, Solé T, et al. Bacterial colonisation in patients with bronchiectasis: microbiological pattern and risk factors. Thorax. 2002;57:15-9.

- Zoumot Z, Wilson R. Respiratory infection in noncystic fibrosis bronchiectasis. Curr Opin Infect Dis. 2010;23:165-70.
- King PT, Holdsworth SR, Freezer NJ, Villanueva E, Holmes PW. Microbiologic follow-up study in adult bronchiectasis. Respir Med. 2007;101:1633-8.
- Bienvenu T, Sermet-Gaudelus I, Burgel PR, Hubert D, Crestani B, Bassinet L, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in non-cystic fibrosis bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181:1078-84.
- Fuschillo S, De Felice A, Alzano G. Mucosal inflammation in idiopathic bronchiectasis: cellular and molecular mechanisms. Eur Respir J. 2008;31:396-406.
- Angrill J, Agustí C, De Celis R, Filella X, Rano A, Elena M, et al. Bronchial inflammation and colonization in patients with clinically stable bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164:1628-32.
- Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med. 2002;347:465-71.
- King P, Holdsworth S, Freezer N, Holmes P. Bronchiectasis. Intern Med J. 2006;36:729-37.
- Miszkiel KA, Wells AU, Rubens MB, Cole PJ, Hansell DM. Effects of airway infection by *Pseudomonas aeruginosa*: a computed tomographic study. Thorax. 1997;52:260-4.
- Davies G, Wells AU, Doffman S, Watanabe S, Wilson R. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* on pulmonary function in patients with bronchiectasis. Eur Respir J. 2006;28:974-9.
- Wilson CB, Jones PW, O'Leary CJ, Hansell DM, Cole PJ, Wilson R. Effect of sputum bacteriology on the quality of life of patients with bronchiectasis. Eur Respir J. 1997;10:1754-60.
- Martínez-García MA, Soler-Cataluña JJ, Perpiñá-Tordera M, Román-Sánchez P, Soriano J. Factors associated with lung function decline in adult patients with stable non-cystic fibrosis bronchiectasis. Chest. 2007;132:1565-72.
- Murphy TF, Sethi S, Klingman KL, Brueggemann AB, Doern GV. Simultaneous respiratory tract colonization by multiple strains of non typeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease: implications for antibiotic therapy. J Infect Dis. 1999;180:404-9.
- Martínez-Somalo Martínez-Solano L, Macía MD, Fajardo A, Oliver A, Martínez JL. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. Clin Infect Dis. 2008;47:1526-33.
- Bilton D, Henig N, Morrissey B, Gotfried M. Addition of inhaled tobramycin to ciprofloxacin for acute exacerbations of *Pseudomonas aeruginosa* infection in adult bronchiectasis. Chest. 2006;130:1503-10.
- Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Bacterial communications in implant infections: a target for an intelligence war. Int J Artif Organs. 2007;30:757-63.
- Macía MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:3382-6.
- Blázquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. Clin Infect Dis. 2003;37:1201-9.
- Tanaka MM, Bergstrom CT, Levin BR. The evolution of mutator genes in bacterial populations: the roles of environmental change and timing. Genetics. 2003;164:843-54.
- Hocquet D, Bertrand X, Köhler T, Talon D, Plésiat P. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:1887-94.
- Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Science. 2000;288:1251-4.
- Hogardt M, Hoboth C, Schmoldt S, Henke C, Bader L, Heesemann J. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis. 2007;195:70-80.
- García-Castillo M, Del Campo R, Baquero F, Morosini MI, Turrientes MC, Zamora J, et al. Stationary biofilm growth normalizes mutation frequencies and mutant prevention concentrations in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect. 2010 Jul 29. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03317.x.

29. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005;13:20-6.
30. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 2003;185:1027-36.
31. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
32. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:167-93.
33. Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton JW. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2003;1:667-83.
34. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson JC, Gibson RL, Burns JL. Use of *Pseudomonas* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:879-86.
35. Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr.* 2007;19:83-8.
36. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:322-32.