



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Evolución temporal de la microbiota fúngica de esputo en pacientes con Fibrosis Quística

Trabajo que presenta la licenciada
Laura Carrasco Hernández para optar al
grado de Doctor en Medicina

Sevilla, Septiembre de 2017

D^a. M^a. ESTHER QUINTANA GALLEGO, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA,
Y TUTORA CLÍNICA UNIVERSITARIA.

D. JOSE LUIS LOPEZ-CAMPOS BODINEAU, PROFESOR ASOCIADO DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

D^a. CARMEN DE LA HORRA PADILLA, DOCTORA EN FARMACIA E
INVESTIGADORA EN EL INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA.

CERTIFICAN: Que Dña. Laura Carrasco Hernández, Licenciada en Medicina, ha
realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “EVOLUCIÓN TEMPORAL DE
LA MICROBIOTA FÚNGICA DE ESPUTO EN PACIENTES CON FIBROSIS
QUÍSTICA”. Revisado el presente trabajo por creer que reúne las condiciones
necesarias, estimamos que puede ser presentado como Tesis Doctoral.

Sevilla, Septiembre de 2017

AGRADECIMIENTOS.

Tras varios años de constante trabajo ya está concluida la Tesis Doctoral, de la cual me siento muy orgullosa. Pero este trabajo no hubiera concluido sin la colaboración de muchas personas que me han acompañado en este largo camino y a las cuales me gustaría agradecer con estas palabras.

En primer lugar, quería agradecer a mis directores de Tesis, a la Dra. Esther Quintana Gallego y al Dr. José Luis López Campos. Durante estos años me han visto crecer profesional y personalmente, y han contribuido a mi desarrollo profesional. Gracias a sus correcciones, sugerencias, su apoyo, sus ideas de las que tanto provecho he sacado, sin que este trabajo no hubiera sido posible y por su incondicional respaldo y amistad.

También agradecer al equipo de laboratorio, coordinado por Carmen de la Horra, por su colaboración en el procesamiento de las muestras y su paciencia para enseñarme las técnicas.

No puedo olvidar a mi familia a la que tanto tengo que agradecer, a mis abuelos, a mi hermano y en especial a mi padre Melchor y mi madre Emi, pues gracias a ellos y sus sacrificios me he convertido en la persona y el médico que hoy soy. Y por supuesto a Alfredo, mi esposo, por su inmensa paciencia, por su gran apoyo, amor y cariño, por estar ahí cuando más lo necesito.

Gracias aquellos que ya no están pero que formaron parte de mi vida.

Gracias a todos por todo.

Tabla de contenido

Introducción.....	1
Antecedentes históricos	2
Epidemiología	5
Genética.....	5
Proteína CFTR.....	6
Mutaciones del gen CFTR.....	8
Fisiopatología.....	11
Manifestaciones clínicas	13
Diagnóstico de la FQ.....	15
Definición de microbiota	16
Microbiología.....	17
Características de las especies fúngicas.....	19
Género Candida.....	22
Género Aspergillus.....	23
Género Pneumocystis	23
Género Scedosporium	24
Técnicas moleculares.....	25
Hipótesis y Objetivos.	27
Hipótesis.....	28
Objetivos	28
Método.	30

Diseño y Población en estudio	31
Criterios de inclusión y exclusión	31
Parámetros evaluados	32
Variables de estudio.....	34
Aspectos éticos.....	35
Técnica de extracción de esputo.....	35
Identificación de microorganismos por métodos estandarizados.....	36
Identificación de microorganismos mediante técnicas moleculares.....	37
Digestión de las muestras.....	37
Extracción del ADN.....	38
Técnicas de amplificación.....	39
Técnica de Clonación	43
Técnica de Secuenciación	44
Controles de calidad	45
Método estadístico	45
Resultados.....	48
Descripción de la muestra	49
Objetivo 1. Identificar por cultivo convencional y por metagenómica la población fúngica.	57
Objetivo 2. Analizar la concordancia entre la identificación convencional y la biología molecular.	66
Objetivo 3. Relacionar la colonización fúngica con otros gérmenes presentes, así como la presencia de coinfecciones.....	70

Pseudomonas.....	70
Staphylococcus	72
Serratia.....	76
Objetivo 4. Analizar los hallazgos microbiológicos con las mutaciones presentes en CTFR y los parámetros clínicos.	102
Discusión.....	120
Mensaje fundamental de la tesis	121
Fortalezas del estudio	122
Limitaciones del estudio	123
Resultados comparados con otros estudios	125
Frecuencia de hongos detectados	128
Candida	128
Aspergillus	130
Pneumocystis	132
Scedosporium.....	134
Malassezia	136
Cryptococcus.....	136
Hongos ambientales	137
Función pulmonar y hongos	137
Tratamiento antifúngico en pacientes con FQ	143
Propuestas de futuro	146
Conclusiones.....	149

Anexo I. Información al paciente y consentimiento informado.....	152
Anexo II. Cuestionario estandarizado de recogida de datos clínicos.....	154
Bibliografía.....	158

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Características fenotípicas de FQ. Modificado de Tratado de FQ (26).	15
Tabla 2. Clasificación taxonómica del reino hongos. Modificada de Boekhout T et al. (41)	21
Tabla 3. Medios de cultivo recomendables, condiciones óptimas de incubación y objetivos de los mismo. Modificada de Oliver A et al (36).	38
Tabla 4. Programa de la PCR semi-nested para el gen ITS: primera ronda.....	41
Tabla 5. Programa de la PCR semi-nested para el gen ITS: segunda ronda	41
Tabla 6. Programa para la PCR-TR para mtLSR rRNA.....	43
Tabla 7. Características de la población.	51
Tabla 8. Pruebas complementarias basales de la población estudiada.	52
Tabla 9. Colonizaciones basales en el año previo de la población estudiada. ...	53
Tabla 10. Tratamientos basales en los 6 meses previos de la población estudiada.....	54
Tabla 11. Diferencias en la detección de hongos entre las técnicas convencionales y las moleculares.....	57
Tabla 12. Concordancia entre técnicas convencionales y metagenómica en visita 1.	67
Tabla 13. Perfil diagnóstico del cultivo convencional en la visita 1.....	67
Tabla 14. Concordancia entre técnicas convencionales y metagenómica en visita 2.	68
Tabla 15. Perfil diagnóstico del cultivo convencional en la visita 2.....	68
Tabla 16. Concordancia entre técnicas convencionales y metagenómica en visita 3.	69
Tabla 17. Perfil diagnóstico del cultivo convencional en la visita 3.....	69

Tabla 18. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 1.....	76
Tabla 19. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 1.....	77
Tabla 20. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 1.....	77
Tabla 21. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 1.....	78
Tabla 22. Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 1 y 2 y la colonización crónica previa por Pseudomonas.....	78
Tabla 23. Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 2 y 3 y la colonización crónica previa por Pseudomonas.....	79
Tabla 24. Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 1 y 3 y la colonización crónica previa por Pseudomonas.....	79
Tabla 25. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 3.....	80
Tabla 26. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 3.....	80
Tabla 27. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 3.....	81
Tabla 28. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 3.....	81
Tabla 29. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 1.....	82
Tabla 30. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 1.....	82

Tabla 31. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 1.	83
Tabla 32. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 1.	83
Tabla 33. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 1.	84
Tabla 34. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 1.	84
Tabla 35. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 3.	85
Tabla 36. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 3.	85
Tabla 37. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 3.	86
Tabla 38. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 3.	86
Tabla 39. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 3.	87
Tabla 40. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 3.	87
Tabla 41. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento por cultivo convencional en visita 1.	88
Tabla 42. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento por metagenómica en visita 1.	88
Tabla 43. Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento por cultivo convencional en visita 1.	89

Tabla 44. Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento por metagenómica en visita 1.	89
Tabla 45. Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 1 y 2 y la colonización crónica previa por Staphylococcus.	90
Tabla 46. Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 2 y 3 y la colonización crónica previa por Staphylococcus.	90
Tabla 47. Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 1 y 3 y la colonización previa por Staphylococcus.	91
Tabla 48. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento por cultivo convencional en visita 2.	91
Tabla 49. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento por cultivo convencional en visita 3.	92
Tabla 50. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamientos por metagenómica en visita 3.	92
Tabla 51. Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamientos por cultivo en visita 3.	93
Tabla 52. Relación entre colonización crónica intermitente previa por Staphylococcus y aislamientos por metagenómica en visita 3.	93
Tabla 53. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 1.	94
Tabla 54. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 1.	94
Tabla 55. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 1.	95
Tabla 56. Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 1.	95

Tabla 57. Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 1.	96
Tabla 58. Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 1.	96
Tabla 59. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 2.	97
Tabla 60. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 3.	97
Tabla 61. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 3.	98
Tabla 62. Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 3.	98
Tabla 63. Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 3.	99
Tabla 64. Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 3.	99
Tabla 65. Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 3.	100
Tabla 66. Relación entre colonización crónica previa por Serratia y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 2.	100
Tabla 67. Relación entre colonización crónica previa por Serratia y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 3.	101
Tabla 68. Relación entre los resultados de la metagenómica en visita 1 y variables clínicas basales.	105
Tabla 69. Relación entre los resultados de la metagenómica en visita 2 con respecto a la visita 1 y las variables clínicas.	107

Tabla 70. Relación entre los resultados de la metagenómica en visita 3 con respecto a la visita 2 y variables clínicas.	109
Tabla 71. Relación entre los resultados de la metagenómica en visita 3 con respecto a la visita 1 y variables clínicas.	111
Tabla 72. Relación entre los resultados de la metagenómica para Candida en visita 3 con respecto a la visita 1 y variables clínicas.....	114
Tabla 73. Relación entre los resultados de la metagenómica para Pneumocystis en visita 3 con respecto a la visita 1 y variables clínicas.....	117
Tabla 74. Estudios realizados sobre función pulmonar y hongos.....	142

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura de la proteína CFTR. El gen que codifica a la proteína CFTR, se localiza en el brazo largo del cromosoma 7. La proteína con los dos dominios transmembrana y los dominios citosólicos (NBD1, NBD2, R, NH2 y COOH). Modificado de www.cysticfibrosismedicine.com	7
Figura 2. Proteína CFTR en la membrana celular y mecanismo de activación. ...	7
Figura 3. Tipos de mutaciones en la FQ (25).....	10
Figura 4. Transporte de electrolitos en el epitelio respiratorio de un paciente con CFTR no funcionante. Modificado de Tratado de FQ (26).....	13
Figura 5. Algoritmo diagnóstico de la Fibrosis Quística (26).	16
Figura 6. Distribución de microorganismos encontrados en los pacientes con FQ por edad (21).....	18
Figura 7. Prevalencia de los microorganismos en los pacientes con FQ (21). ...	18
Figura 8. Cebadores utilizados para la identificación de diferentes ITS de hongos. (54).....	40
Figura 9. Distribución del seguimiento en la población de estudio.	50
Figura 10. Distribución de antibioterapia oral utilizada 6 meses previos del inicio del estudio.	55
Figura 11. Distribución de antibioterapia intravenosa utilizada 6 meses previos del inicio del estudio.	55
Figura 12. Detección hongos por ambas técnicas en la visita 1.....	61
Figura 13. Detección hongos por ambas técnicas en la visita 2.....	61
Figura 14. Detección hongos por ambas técnicas en la visita 3.....	62
Figura 15. Progresión en el tiempo de los cultivos convencionales.....	63
Figura 16. Progresión en el tiempo de los cultivos por metagenómica.....	63

Figura 17. Progresión en el tiempo de los cultivos por metagenómica del género <i>Candida</i>	64
Figura 18. Progresión en el tiempo de los cultivos por metagenómica del género <i>Aspergillus</i>	64
Figura 19. Progresión en el tiempo de los cultivos por metagenómica del género <i>Pneumocystis</i>	65
Figura 20. Evolución funcional de la FVC durante el año de seguimiento.	104
Figura 21. Evolución funcional del FEV ₁ durante el año de seguimiento.	104

ABREVIATURAS.

ABC: ATP-Binding Cassette

ADN: ácido desoxiribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

BAL: lavado broncoalveolar

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Cl⁻: cloro

CRD: cuaderno de recogida de datos

DMRFQ: diabetes mellitusdiabetes relacionada con la FQ

DS: desviación estándar

EDTA: etildiaminotetraacético

FEV₁: volumen espirado en el primer segundo

FQ: fibrosis quística

FVC: capacidad vital forzada

HGVS: Human Genome Variation Society

H₂O: agua

IgE: Inmunoglobulina E

IMC: Índice de masa corporal

ITS: Internal Transcribed Spacers

K⁺: potasio

MR: meticilín-resistente.

MS: meticilín-sensible

MRSA: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Na⁺:sodio

NBD: Nucleotide Binding Domain

NTP: nucleótido trifosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR-DGGE: polimerase chain reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

PCR-TR: PCR a tiempo real o cuantitativa

rRNA: ribosomal ribonucleic acid

SDS: dodecilsulfato sódico

FINANCIACIÓN DEL PROYECTO.

Este proyecto con número de expediente PS09/00957, ha sido financiado desde el 1 de Enero de 2011 hasta el 31 de Diciembre de 2013 por el Instituto de Salud Carlos III. Cuya investigadora principal fue Carmen de la Horra Padilla. Y con una Beca Neumosur N°12-2009 presentada por Esther Quintana Gallego como investigadora principal.

ACTIVIDAD CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS DOCTORAL.

- Valoración metagenómica de la microbiota fúngica de esputo en pacientes con fibrosis quística.

L. Carrasco Hernández, M. Abad Arranz, C. De la Horra Padilla, E. Quintana Gallego, V. Friaza Patiño, E-J Calderón Sandubete, J.M Valera Aguilar. Presentado en formato póster en el 39º. Congreso Neumosur. Badajoz 14-17 Marzo 2013

- Valoración metagenómica de la microbiota fúngica de esputo en pacientes con fibrosis quística.

L. Carrasco Hernández, M. Abad Arranz, C. De la Horra Padilla, E. Quintana Gallego, V. Friaza Patiño, E-J Calderón Sandubete, J.M Valera Aguilar.

Presentado en formato póster en el 46º. Congreso Nacional SEPAR.

Barcelona 14 -17Junio 2013.

- Fungi communities detected by metagenomic tools in sputum in patients with cystic fibrosis.

L. Carrasco Hernández, M. Abad Arranz, C. De la Horra Padilla, E. Quintana Gallego, V. Friaza Patiño, E-J Calderón Sandubete, J.M Valera Aguilar.

Presentado en formato póster en el Congreso ERS. Barcelona. 7-11

Septiembre de 2013.

- Evolución temporal de la microbiota fúngica en pacientes con fibrosis quística.

L. Carrasco Hernández, E. Quintana Gallego, I. Delgado Pecellín, C. Calero Acuña, JL López Campos Bodineau, C. De la Horra Padilla.

Presentado en formato póster en el 41º Congreso Neumosur. Córdoba. 19-21

Marzo 2015.

- Evolución temporal de la microbiota fúngica en pacientes con fibrosis quística.

L. Carrasco Hernández, E. Quintana Gallego, I. Delgado Pecellín, C. Calero Acuña, JL López Campos Bodineau, C. De la Horra Padilla.

Presentado en formato póster en el 48º Congreso Nacional SEPAR. Gran

Canaria. 5-8 Junio 2015.

- Temporal progression of fungal microbiota in patients with cystic fibrosis.

L. Carrasco Hernández, C. López Ramírez, E. Quintana Gallego, I. Delgado Pecellín, C. Calero Acuña, JL López Campos Bodineau, C. De la Horra Padilla.

Presentado en formato comunicación oral en el Congreso ERS. Amsterdam. 26-30 Septiembre de 2015.
- Estudio prospectivo de la microbiota fúngica de esputo en pacientes con fibrosis quística.

L. Carrasco Hernández, E. Quintana Gallego, I. Delgado Pecellín, J.L López-Campos, C. De la Horra Padilla.

Presentado en formato comunicación oral en el 43º Congreso Neumosur. Málaga. 23-26Marzo de 2017.
- Microbiota fúngica de esputo en pacientes con fibrosis quística.

L. Carrasco Hernández, E. Quintana Gallego, I. Delgado Pecellín, J.L López-Campos, C. De la Horra Padilla.

Presentado en formato póster en el 50º CongresoCongreso Nacional SEPAR. Junio. 2-5 de 2017.
- Fungal microbiota in patients with cystic fibrosis.

L. Carrasco Hernández, E. Quintana Gallego, I. Delgado Pecellín, M.Domínguez Begines, JL. López-Campos, C. De la Horra Padilla.

Presentado en formato póster discusión en el 40º European cystic fibrosis conference. Junio. 7-10 de 2017.

Introducción.

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad genética más común, de herencia autosómica recesiva que afecta a la raza caucásica. La enfermedad se produce por mutaciones en el gen que codifica la denominada proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). La proteína CFTR se encuentra presente en las membranas celulares de células epiteliales del aparato respiratorio, páncreas, vías biliares, glándulas sudoríparas y en el sistema genitourinario, ejerciendo su función como canal de transporte de cloro, esencial para la regulación de sal y agua a través de las membranas celulares(1). Al encontrarse este canal expresado en varios órganos, va a dar lugar a diferentes manifestaciones clínicas, otorgándole el papel de enfermedad multisistémica.

Antecedentes históricos

Son muchos los conocimientos sobre FQ, que se han adquirido a lo largo del tiempo, algunos de ellos revolucionarios. Las primeras descripciones de esta patología se encuentran recogidas en el folclore popular del Norte de Europa, en los que se hablaba de unos niños que presentaban un sabor salado al besarlos y que tenían una muerte precoz (2). Las primeras descripciones histopatológicas de la FQ se realizaron en el siglo XVI, por Peter Paaw en Holanda.

En los años 30 se observaron anomalías pancreáticas en las autopsias de algunos bebés que padecían el llamado “Síndrome Celíaco”. Dorothy Andersen (3), patóloga de Nueva York, revisó sus propios casos y los describió como una “Enfermedad fibroquística del páncreas”. Fue en los años 40 cuando, Sidney Farber, reconoció que la FQ era un desorden generalizado, más que un síndrome de malabsorción e introdujo el término de mucoviscidosis (4). Pronto sería descrita el tipo de herencia genética, autosómica recesiva (5), por la que se

caracteriza dicha enfermedad. El mayor avance, de este periodo fue, el primer uso de la penicilina en 1946 (6) y posteriormente de otros antibióticos. Tras la postración por calor sufrido por algunos lactantes con FQ durante la ola de calor de 1948 en Nueva York, Paul di Sant'Agnese identificó el alto contenido de sal en el sudor, convirtiéndose el test del sudor en la principal prueba diagnóstica(7). Posteriormente, se empezó a utilizar la iontoforesis con pilocarpina para estimular el sudor (8).

En 1955 comienzan a crearse las primeras Unidades de Atención Especializada integrando un tratamiento multidisciplinario y desde entonces el pronóstico de la enfermedad ha ido aumentando de forma progresiva. Durante los años sesenta hubo un progreso clínico modesto, pero aún era desconocida la naturaleza del defecto y había pocos científicos que investigaban en el problema.

Es a principios de los años setenta, cuando Douglas Crozier, cambia a sus pacientes afectados de FQ a una dieta alta en grasa saturada junto con la toma de enzimas pancreáticas, 60-100 diarias, comprobando una mejora en el estado nutricional, crecimiento y supervivencia (9). Se mostraron estudios donde se comprobó que la infección crónica por *Pseudomonas*, llevaba a un mal pronóstico y una mejora en la supervivencia con la administración de ciclos de antibióticos (10).

La década de los 80, fue una época de progreso científico y clínico. Se demostró una alteración en el potencial de membrana intranasal (11), un defecto en el intercambio del cloro, se encontró un marcador en el cromosoma 7 relacionado con la FQ y en 1989 fue finalmente identificado el gen de la FQ, denominado gen regulador de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (12). En los años 90, se demostró la mutación genética más

frecuente, la Phe508del. Otros de los avances importantes de esta época, fue el uso de la prueba tripsina inmunorreactiva para el cribado neonatal, convirtiéndose en la base de la mayoría de los programas de cribado neonatal de FQ (13). Una terapia revolucionaria, para aquellos pacientes que habían llegado a las etapas finales de su enfermedad, era un trasplante de corazón y pulmón.

La mejora en la perspectiva que caracterizó los años ochenta continuó a través de los años noventa como resultado de la mejora constante de la atención y la creciente especialización del personal de los Centros de FQ, ahora bien, establecidos en muchos países. El arsenal terapéutico disponible comienza a ampliarse con la DNasa humana recombinante, el primer mucolítico realmente eficaz (14), una nueva preparación de tobramicina para inhalación (15), y de azitromicina también para los pacientes con infección crónica por *Pseudomonas*.

En la actualidad, dos enfoques tienen por objetivo corregir el defecto básico: la terapia genética, dirigida a corregir la alteración genética, y la terapia con moléculas encaminadas a corregir el defecto funcional a nivel de la proteína CFTR. Esta última comienza a dar resultados prometedores con diversas moléculas en desarrollo y una de ellas (ivacaftor) ya comercializadas para la mutación de clase III, denominadas según la nomenclatura clásica como G551D o Gly551Asp según la Human Genome Variation Society (HGVS), con excelentes resultados en niños > de 2 años, adolescentes y adultos. El objetivo final será a través de la terapia correctora y potenciadora poder llegar a dar respuesta a todos los pacientes con FQ cualquiera que sea su mutación. Es probable que, conforme se vayan teniendo resultados de éstas y otras moléculas nuevas, haga falta una molécula o combinación de estas según la o las mutaciones existentes en cada paciente, pero el futuro es prometedor y se están

dando importantes pasos para conseguir un tratamiento que consiga actuar de forma efectiva sobre la causa de la enfermedad.

Epidemiología

La FQ tiene una incidencia de 1 por cada 2.500-6.000 recién nacidos, dependiendo de la región y de la etnia de origen, y un porcentaje de portadores sanos también variable entre 1:20-37(16). Cada año, nace en EE.UU, 3.500 recién nacidos con FQ. Es una enfermedad que afecta a la raza blanca (caucásica) más que a otras razas. Sobre 30.000 personas padecen FQ en EE.UU(17), 32.000 personas en Europa y sobre 85.000 a nivel mundial(18). En España, gracias a la progresiva implantación de los programas de cribado neonatal en las distintas comunidades, se está reconociendo una incidencia inferior a la estimada con anterioridad, siendo en 2009 de: 1/4.430 recién nacidos vivos en Galicia, 1/4.339 en Castilla y León, 1/5.376 en Murcia, 1/5.840 en Cataluña y 1/6.602 en Baleares (19).

La mediana de edad de supervivencia de las personas con FQ ha aumentado de forma constante durante los últimos 25 años.(20) Desde 2002, la mediana de edad de supervivencia se ha incrementado en casi 10 años, de 31,3 años en 2002 a 41,1 años en 2012.(17) Para 2010-2015, la mediana de supervivencia de edad es de 41,7 años (intervalo de confianza del 95% de 38,5-44)(21).

Genética

El gen que codifica la proteína CFTR está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (22). La herencia mendeliana, mediante el cual se transmite la enfermedad es autosómica recesiva.

Los portadores de la FQ, tiene un gen sano y un gen mutado, estas personas no padecen la enfermedad porque el gen sano facilita la producción de una proteína

normal. Cuando dos personas portadoras del gen de la FQ tienen descendencia, tienen una probabilidad de tener hijos con FQ del 25%, un 25% sano y un 50% será sano portador de la enfermedad. Por lo tanto, la persona enferma necesita heredar dos copias del gen CFTR mutado de sus padres, que son portadores de la enfermedad.

El gen CFTR está constituido por una secuencia genómica de 230 kb organizada en 27 exones. El ácido desoxirribonucleico complementario identifica un transcrito de 6,1 kb con 4.400 nucleótidos que codifican una proteína de 1.480 aminoácidos y un peso molecular de 170 kDa, denominada proteína CFTR(2). La proteína CFTR pertenece a la familia de transportadores ABC (ATP-Binding Cassette) (23), es decir es una proteína regulada por Adenosín monofosfato cíclico.

Proteína CFTR

Estructuralmente, está formada por 5 dominios (

Figura 1): dos dominios transmembranas constituido cada uno por seis segmentos, un dominio regulador (R) y dos dominios de unión al Adenosín trifosfato (ATP), los llamados Nucleotide Binding Domain 1 y 2 (NBD1, NBD2). Los dominios NBD1, NBD2, el dominio R y los extremos NH₂- y COOH-terminal se encuentran en el citosol (2).

Para que tenga lugar, la activación del canal (proteína CFTR), se requiere de una compleja regulación en la que intervienen la fosforilación del dominio R mediante proteína quinasa A y la posterior unión e hidrólisis de ATP en los dominios NBDs. La unión del ATP con el dominio citosólico NBD1 produce la hidrólisis de ATP dando lugar al inicio de la apertura del canal.

Cuando se produce la unión ATP con el dominio NBD2 (Figura 2), se estabiliza el canal abierto. Finalmente, la hidrólisis de ATP en NBD2 conduce al cierre del canal. Si el dominio R se mantiene fosforilado, los ciclos de unión e hidrólisis de ATP se suceden y el canal se abre y cierra regularmente (24).

Figura 1. Estructura de la proteína CFTR. El gen que codifica a la proteína CFTR, se localiza en el brazo largo del cromosoma 7. La proteína con los dos dominios transmembrana y los dominios citosólicos (NBD1, NBD2, R, NH2 y COOH). Modificado de www.cysticfibrosismedicine.com

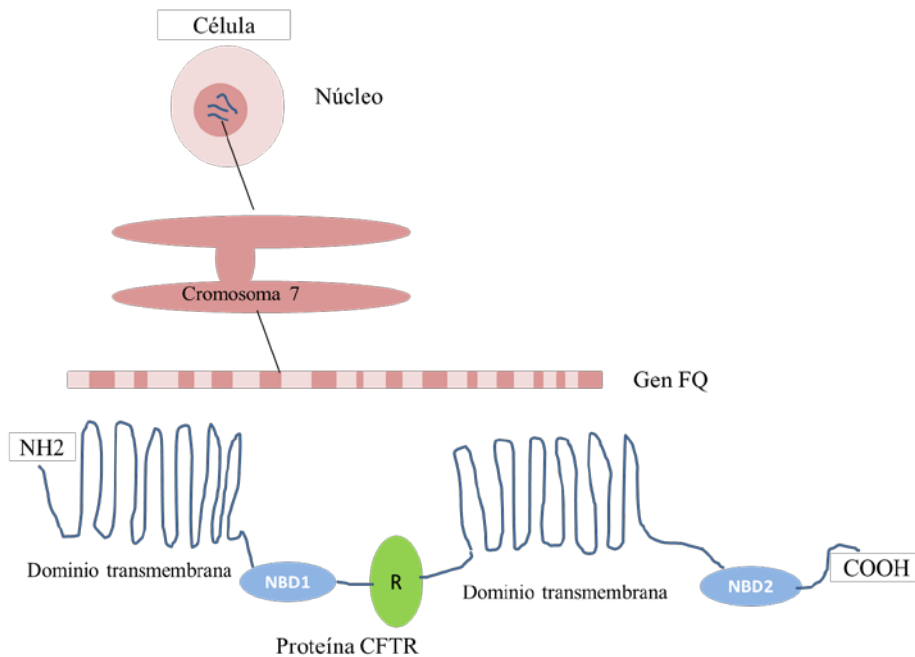
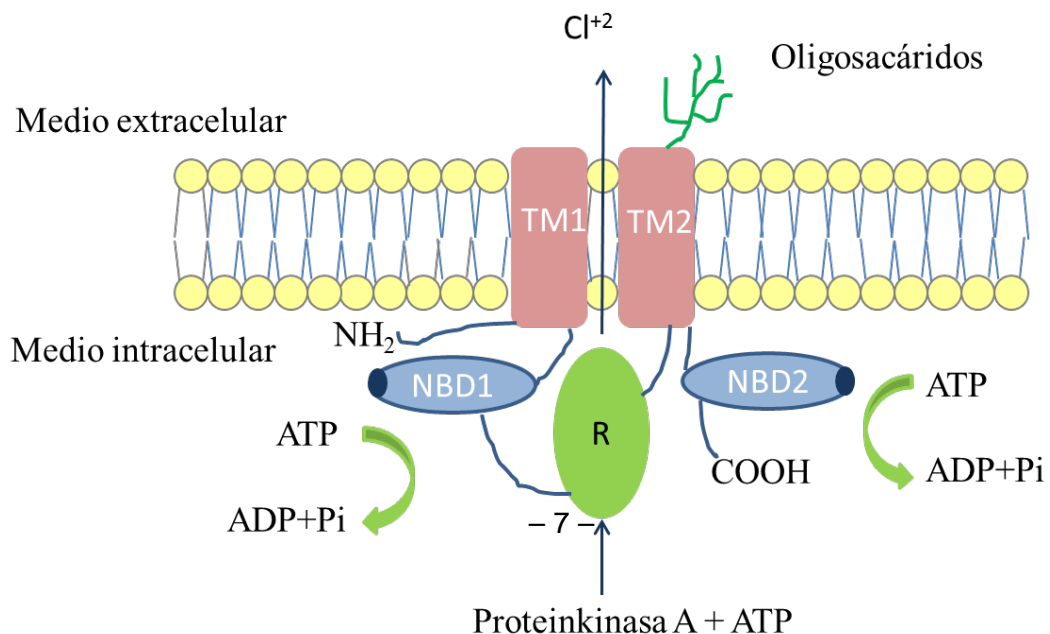


Figura 2. Proteína CFTR en la membrana celular y mecanismo de activación.



Mutaciones del gen CFTR

Hasta el momento se han identificado más de 2.000 mutaciones del gen CFTR asociadas a la enfermedad, tanto en la secuencia codificadora, como en el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) o en otras regiones(25). La primera mutación descrita, y la más frecuente a nivel mundial, es la Phe508del, pero existen otras mutaciones específicas cuya frecuencia varía entre los distintos grupos étnicos(1). En España se ha descrito una frecuencia media de la Phe508del entre 50-60% del total de los cromosomas estudiados en los pacientes afectados de FQ, siendo la segunda en frecuencia la Gly542* con un 4-8%, seguida por la Asn1303Lys con un 2-4%.

Son varios los tipos de mutaciones, los que pueden producir una proteína anómala(26):

- Delección/Inserción en la región codificante. Si estas alteraciones son múltiplo de tres bases (cada tres nucleótidos codifican para un aminoácido), la proteína resultante tendrá un número de residuos menor/mayor del normal. Si no es múltiplo de tres, la pauta de lectura cambiara a partir de la mutación, y los aminoácidos incorporados variarán desde este punto.
- Cambios de base. Si se produce un cambio de base en una determinada posición, es posible que se incorpore un aminoácido distinto del original o que este cambio codifique un triplete de finalización de traducción (codón STOP). Si el cambio no afecta a la funcionalidad de la proteína o codifica

para el aminoácido original, entonces se habla de polimorfismo y no de mutaciones causantes de enfermedad.

- Mutaciones en regiones intrónicas. Estas mutaciones afectan sobre todo al fenómeno de maduración del ARNm. Pueden aparecer formas maduras anómalas que den lugar a proteínas alteradas y poco o nada funcionales.
- Mutaciones en las regiones promotoras. Afectan a los niveles de transcripción haciendo que las cantidades de proteína sean menores de lo normal.

Las mutaciones del gen CFTR, se clasifican en 6 tipos(1,25) en función de las consecuencias que tienen sobre la proteína (Figura 3):

- La clase I, síntesis defectuosa, incluyen mutaciones que conducen a un codón de parada prematuro en el ARNm que impiden que la proteína se traduzca al completo. Por tanto, la proteína producida es corta y no funcionante. Son mutaciones de este grupo Gly542*, Leu1258Phefs*7 o 621+1G>T.
- Las mutaciones de clase II, codifican una proteína mal plegada estructuralmente anormal y que se elimina por el retículo endoplásmico antes de llegar a la superficie de la célula. En este proceso actúan las chaperonas, son proteínas presentes en las células que ayudan al plegamiento de otras proteínas recién formadas en las síntesis de proteínas. Las chaperonas interaccionan con la proteína, de tal forma que estas proteínas inmaduras se anclan a las chaperonas y se degradan en el retículo endoplásmico. En este grupo se incluye la mutación más frecuente, la Phe508del.

- Las mutaciones de clase III producen una disminución de la activación del canal y permanecen cerradas. (Gly551Asp).

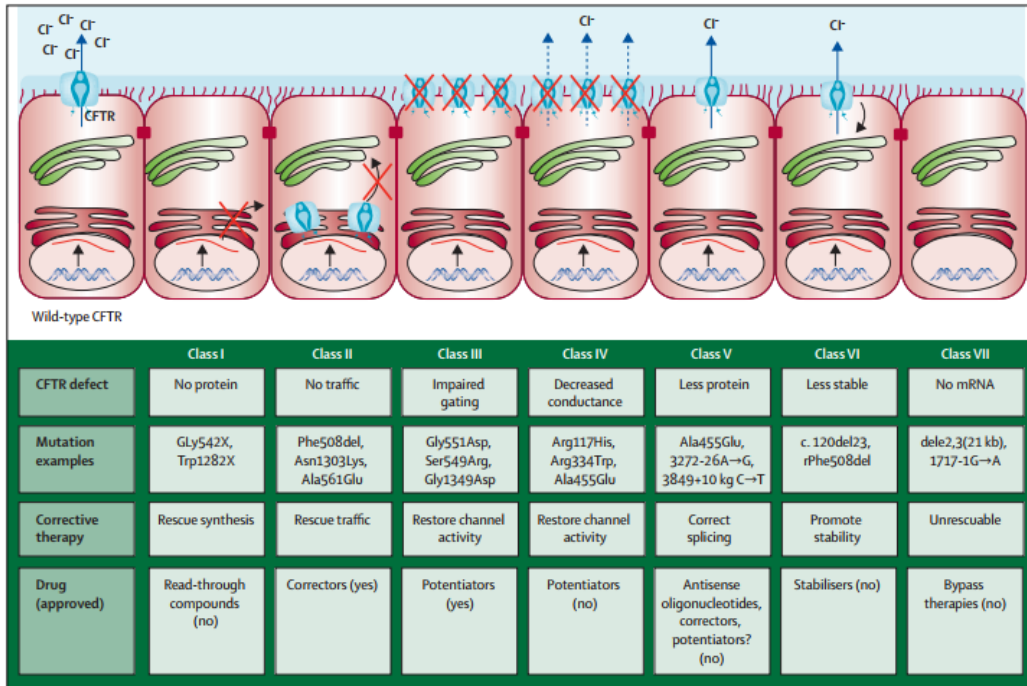


Figura 3. Tipos de mutaciones en la FQ(25).

- La clase IV o conductancia alterada del canal cloro. Está constituida por mutaciones que cambian los aminoácidos que forman el poro del canal, provocando una disminución de la conductibilidad de iones a través del canal (Arg334Trp, Arg117His, Afirg347His). La mutación Arg334Trp es relativamente frecuente en los pacientes de origen español (1,1%) mientras que su frecuencia en la población mundial es del 0,1%.
- Las mutaciones de clase V codifican proteínas en menor cuantía que resulta en una cantidad reducida de CFTR en la superficie celular, por lo

que se produce una cierta función, pero a un nivel disminuido. (2657+5G>A, 3718-2477C>T)(2).

- La clase VI está formada por mutaciones que determinan la pérdida del extremo COOH- terminal, reduciendo la estabilidad de la molécula y también pueden dañar la regulación de los canales vecinos a la CFTR en la superficie celular. (4279insA).
- Finalmente, la clase VII, recientemente incorporadas a la clasificación. (25). Son las llamadas mutaciones incontrolables porque ellas no pueden ser rescatadas mediante el uso de fármacos. Por ejemplo, las grandes deleciones como dele2,3(21kb).

En general, las mutaciones de clase I-III impiden la maduración de la proteína y se asocian a un fenotipo de FQ grave en relación a insuficiencia pancreática exocrina, mientras que las mutaciones de clase IV-VI están asociadas a una amplia variabilidad fenotípica. En las mutaciones de las clases III a VI las proteínas llegan a la superficie de la célula, pero no funcionan adecuadamente(1).

Fisiopatología

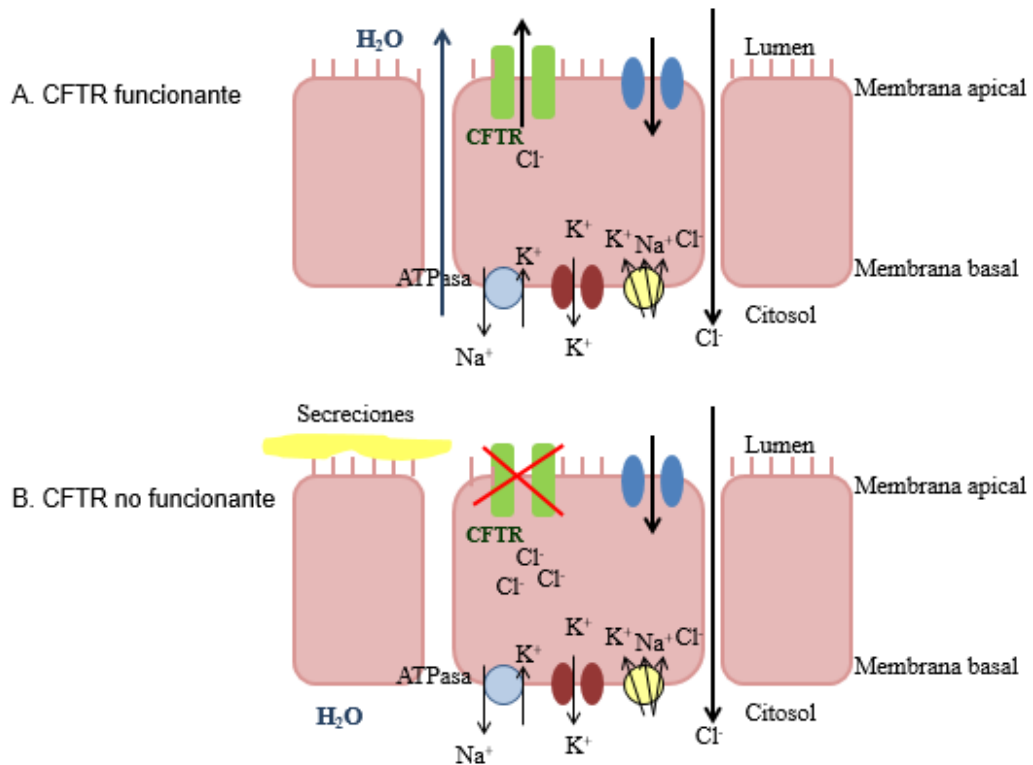
La alteración en el transporte del ion cloro, junto con el del transporte del ion sodio (Na^+) y el agua (H_2O), es la anomalía responsable de la fibrosis quística. Como consecuencia de esta anomalía se producen secreciones espesas a nivel del páncreas, las vías biliares, glándulas sudoríparas, aparato genital (epidídimo y cuello cervical) intestino y aparato respiratorio (tanto en la vía aérea superior como inferior). El moco espeso y viscoso obstruye los conductos del órgano donde se localiza dando lugar a repercusiones multisistémicas que condicionan la variedad de sus manifestaciones clínicas.

La fisiopatología en las glándulas sudoríparas es diferente al del resto de glándulas. En la glándula sudorípara sana, iones cloruro (Cl^-) y Na^+ salen a la luz en la parte proximal de las glándulas sudoríparas con el fin de arrastrar agua y excretarla en la superficie de la piel para la termorregulación corporal; para ahorrar iones, la mayor parte de Na^+ y Cl^- se reabsorbe en la parte distal que es impermeable al agua. En los pacientes con FQ al existir una anomalía en canal CFTR, el ion cloro no puede ser transportado al interior de la célula, no pudiéndose reabsorber el Na^+ , por lo que ambos son eliminados. Como consecuencia los pacientes presentan un exceso de cloruro sódico en el sudor, dando lugar a un característico sudor salado (2).

En las células epiteliales del aparato respiratorio, el Cl^- penetra en las células a través de un co-transportador que introduce potasio (K^+) y expulsa Na^+ situado en la membrana basal. El Cl^- acumulado en el citosol es expulsado al exterior a través de los canales de Cl^- , localizados en la membrana apical. Acompañando al Cl^- , se produce la salida de H_2O lo que favorece la fluidez de las secreciones (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En los pacientes con FQ, al encontrarnos con un canal anómalo o ausencia de este, la salida del Cl^- queda bloqueada, y por tanto una reducción de la salida de H_2O . A nivel de la membrana basal, el Na^+ es reabsorbido junto al H_2O , dando como resultado unas secreciones deshidratadas y viscosas(26,27).

La falta de fluidez de las secreciones y la alteración del movimiento de los cilios por la viscosidad de la mucosidad favorece una limpieza inadecuada, dando como resultado la obstrucción de los bronquios y las infecciones respiratorias.

Figura 4. Transporte de electrolitos en el epitelio respiratorio de un paciente con CFTR no funcionante. Modificado de Tratado de FQ (26)



Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la FQ son muy variables debido al carácter multisistémico de la enfermedad, afectando aparato digestivo, respiratorio, glándulas sudoríparas, aparato genital... etc.

Las denominadas, manifestaciones clásicas de la FQ (Tabla 1), son la tos crónica con expectoración, sinusitis o poliposis nasal, presencia de acropaquias, colonización por gérmenes típicos (*Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*), bronquiectasias, síntomas gastrointestinales por la insuficiencia pancreática exocrina, esterilidad por azoospermia obstructiva y un sudor con alta concentración de sal (28).

No obstante, estas manifestaciones pueden no estar presentes en todos los pacientes con FQ, debido a la variabilidad de la presentación de esta enfermedad.

Los síntomas digestivos y la deshidratación suelen ser los primeros en aparecer. Sin embargo, la edad de comienzo de los síntomas respiratorios es muy variable, pudiendo aparecer a diferentes etapas de la vida. La afectación pulmonar está presente de forma casi universal en los adolescentes y los adultos (2) y es la primera causa de morbi-mortalidad. Algunos autores relacionan las distintas mutaciones genéticas con las mutaciones más o menos graves y una presentación más o menos precoz (28,29).

El síntoma inicial de la FQ es la tos crónica, seguida de la expectoración que al inicio de la vida es blanquecina, modificando su purulencia con el tiempo. El exceso de secreciones respiratorias espesas y viscosas, conducen a una obstrucción, inflamación e infección de las vías respiratorias inferiores. Sobre esta base patogénica, se presentan las denominadas exacerbaciones agudas que afectan de manera más o menos importante a la función pulmonar debido probablemente a un incremento de la carga bacteriana habitual y a la respuesta del huésped (30).

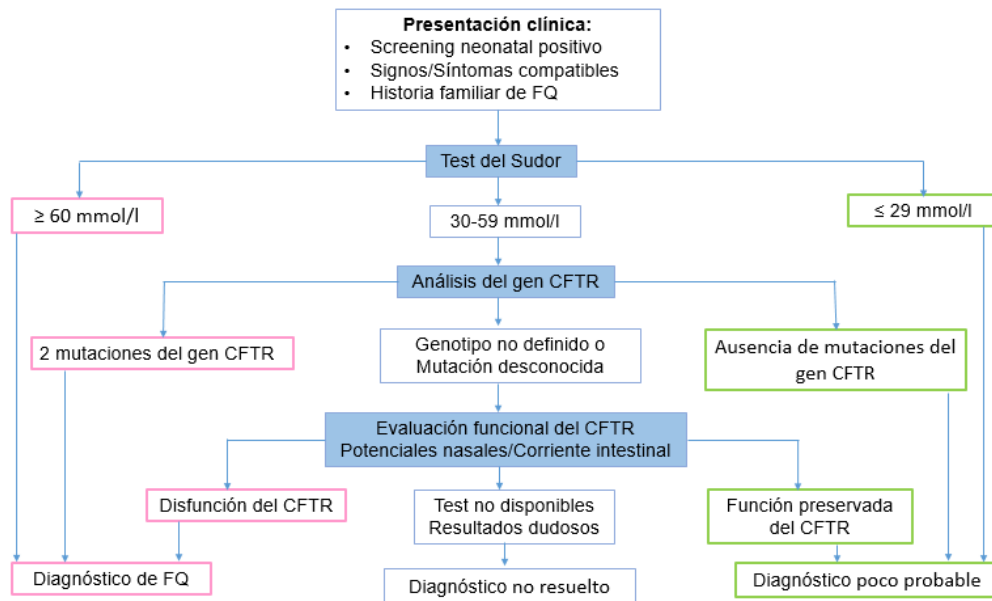
Tabla 1. Características fenotípicas de FQ. Modificado de Tratado de FQ (26).

Enfermedad sinopulmonar crónica
<ul style="list-style-type: none"> • Colonización/infección persistente con patógenos típicos de FQ: <i>S. aureus</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>P. aeruginosa</i> mucoide y no mucoide y <i>B. cepacia</i> • Tos y expectoración crónica • Alteraciones persistentes en la radiografía del tórax (p. ej.: bronquiectasias, atelectasias, infiltrados, hiperinsuflación) • Obstrucción de las vías aéreas puesta de manifiesto por sibilancias y atrapamiento aéreo • Pólipos nasales; anomalías radiológicas de los senos paranasales • Acropaquias
Alteraciones gastrointestinales y nutricionales
<ul style="list-style-type: none"> • Intestinales: íleo meconial, síndrome de obstrucción intestinal distal, prolapso rectal • Pancreáticas: insuficiencia pancreática, pancreatitis recurrente • Hepáticas: enfermedad hepática crónica puesta de manifiesto por evidencia clínica o histológica de cirrosis biliar focal o de cirrosis multilobular • Nutricionales: malnutrición proteico-calórica, hipoproteïnemia y edema, complicaciones secundarias a deficiencia de vitaminas liposolubles
Síndromes de pierde sal
<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida aguda de sal • Alcalosis metabólica crónica
Alteraciones urogenitales en el varón
<ul style="list-style-type: none"> • Azoospermia obstructiva (ausencia bilateral congénita de conductos deferentes)

Diagnóstico de la Fibrosis Quística

Para realizar el diagnóstico de la FQ, debemos realizar en primer lugar, el test del sudor, considerado el método Gold estándar para el diagnóstico y posteriormente el estudio de las mutaciones genéticas del CFTR. Recientemente ha sido publicado un consenso sobre el diagnóstico de la FQ (31), que se muestra en la siguiente figura.

Figura 5. Algoritmo diagnóstico de la Fibrosis Quística (26).



Definición de microbiota

Antes de comenzar a hablar sobre los microorganismos que son encontrados en las vías respiratorias de los pacientes con FQ, es necesario conocer qué es la microbiota. Se define microbiota, como colección de microorganismos que cohabitan con el huésped y que han desarrollado una relación íntima con éste (32). Está predominantemente compuesta por bacterias, pero también se ha comprobado que forma parte de ella hongos (conocida como microbiota fúngica o microbioma) y virus (viroma)(33). En el hombre adulto se estima que existen del orden de 10^{14} microorganismos. La microbiota es característica de cada tejido y está presente en zonas del individuo expuestas al exterior (como puede ser la cavidad oral o el tracto respiratorio).

Existen estudios que explican los cambios dinámicos en la microbiota tanto espacial como temporalmente (32), cambios que van a depender de la interacción entre microorganismos, el estado inmunológico del huésped y los factores medioambientales. Es importante tener conocimiento sobre la microbiota, ya que interacciones entre microorganismos pueden explicar en parte, las exacerbaciones infecciosas.

En los últimos años, la microbiota fúngica o micobioma, ha llamado la atención de los investigadores, obteniéndose la evidencia de que la microbiota fúngica pudiera tener un impacto clínico (actuar como cofactor en la inflamación y en la respuesta inmune del huésped y por lo tanto puede contribuir a la disminución de la función pulmonar y la progresión de la enfermedad) en los pacientes con enfermedades pulmonares crónicas como es la FQ. Este nuevo conocimiento es debido al desarrollo de las técnicas cultivos independientes, que permiten identificar hongos no cultivables por métodos convencionales (33).

Microbiología

Los patógenos bacterianos que colonizan la vía aérea en los pacientes con FQ lo hacen frecuentemente siguiendo una secuencia, más o menos establecida, dependiendo de la edad (Figura 6). Los patógenos que con mayor frecuencia son aislados, son *P. aeruginosa* y *S. Aureus*(2).

En los niños pequeños con FQ, *S. aureus* es a menudo el primer microorganismo que se aísla, decreciendo éste con la edad. A medida que los pacientes crecen aumenta la colonización por *Pseudomonas aeruginosa*, de tal forma que en la edad adulta el 70% de los pacientes con FQ están colonizados por *P. aeruginosa* siendo la responsable en gran parte del deterioro progresivo de la función respiratoria (17). Aunque existe una alta prevalencia en este grupo

etario, la prevalencia de *P. aeruginosa* continúa disminuyendo, debido principalmente a la implementación de una terapia erradicadora cuando se obtiene un primer aislamiento. En cuanto a *S. Aureus* y *MRSA* (por sus siglas en Inglés, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) se ha producido un incremento, debido a la mejora de las técnicas de detección de los microorganismos Gram positivos. Desde 2010 como observamos en la figura 6, la curva de prevalencia se ha mantenido en meseta. Dicha estabilización puede estar relacionada con el incremento de las medidas preventivas usadas para controlar las infecciones. (21,34,35).

Figura 6. Distribución de microorganismos encontrados en los pacientes con FQ por edad (21).

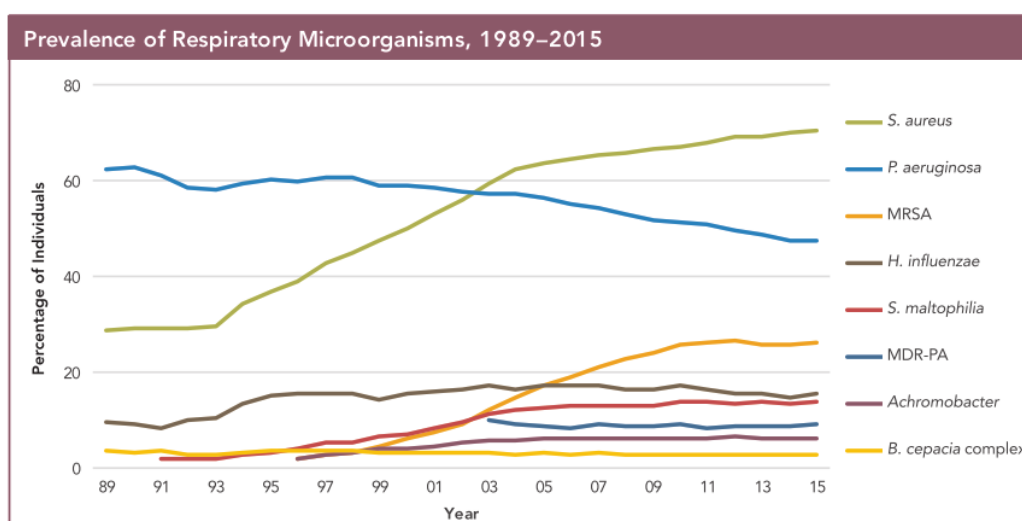
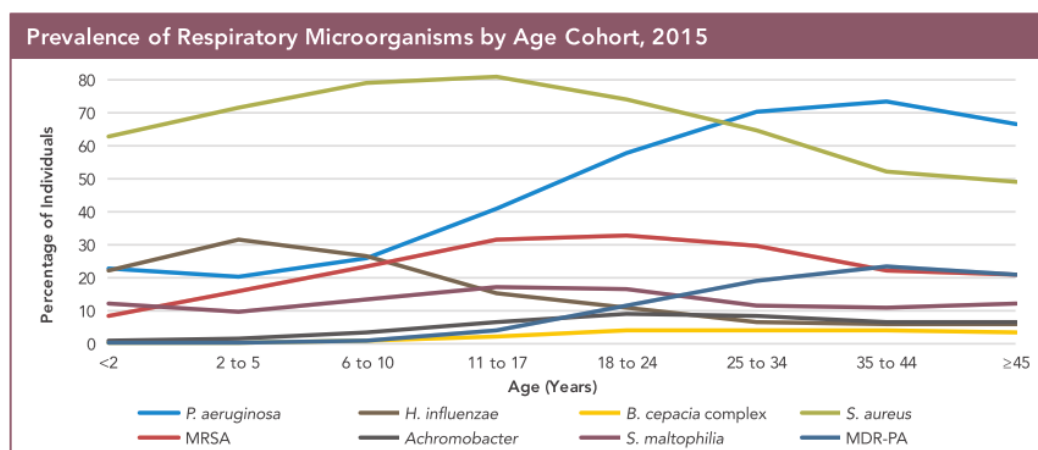


Figura 7. Prevalencia de los microorganismos en los pacientes con FQ (21).



Debido a la mayor expectativa de vida de estos pacientes y al hecho de que se utilicen ciclos repetidos de antibióticos para controlar las exacerbaciones, se ha favorecido la colonización por otros patógenos como *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *A. xylooxidans*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micobacterias no tuberculosas* (*M. abscesus*, *M. avium*) así como diferentes tipos de hongos (*Aspergillus*, *Candida*) (36). Entre los hongos filamentosos, *Aspergillus fumigatus* es el más común, pero existen otras especies como *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium prolificans*, *Aspergillus terreus* y *Exophiala dermatitidis*. No debemos de olvidarnos de *Pneumocystis jirovecii* que se comporta como colonizador del tracto respiratorio de los pacientes con FQ aunque no se descarta su rol en la respuesta inflamatoria local(37).

Características de las especies fúngicas

Hoy día, las especies fúngicas están ganando importancia en la producción de enfermedades debido al aumento de población inmunodeprimida (trasplantes de órganos, terapia corticoidea, tratamiento inmusupresores, antibiótico prolongados...)

Al menos 50 hongos de las 100.000 especies son conocidos como patógenos primarios en humanos (

), siendo muchos reconocidos como agentes colonizadores en diferentes muestras y ahora son identificados como causantes de enfermedad en humanos en presencia de factores favorecedores(38). En la fibrosis quística, la colonización infección fúngica de las vías respiratorias es frecuente debido al tratamiento prolongado antimicrobiano, corticoideo y por la existencia de

bronquiectasias, aunque se desconoce el papel que ejercen en la patogénesis de la enfermedad(39).

Los hongos son microorganismos eucariotas, que se clasifican en su propio reino, el reino Hongos. La clasificación morfológica, agrupa a los hongos en levaduras y formas miceliales. Se define a levadura como un microorganismo unicelular que se reproduce mediante gemación o fisión, de modo que la célula progenitora se desprende de una porción propia para producir una descendiente. Esta célula hija se puede alargar y da lugar a lo que se conoce como pseudohifa. Las formas miceliales son microorganismos pluricelulares formados por unas estructuras tubulares conocidas como hifas, cuyos extremos se alargan mediante un proceso denominado extensión apical.

La mayoría de las especies fúngicas son aerobias, aunque existen algunas especies anaerobias, y de crecimiento lento. Su forma de reproducirse es mediante la formación de esporas, las cuales pueden ser sexuales, conociéndose al hongo productor de este tipo de esporas como telemorfo; y asexuales, en este caso el hongo productor de estas esporas se denomina anamorfo(40).

La clasificación taxonómica del reino de los hongos ha cambiado mucho a lo largo de las últimas décadas, en la actualidad se clasifican en 7 filos, siendo tres filos los que tienen importancia médica (*Zygomycotas*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*) y en los que nos vamos a centrar(41).

Tabla 2. Clasificación taxonómica del reino hongos. Modificada de Boekhout T et al. (41)

Filo	Género	Especie
Cigomycotas	<i>Lichtheimia</i>	<i>Lichtheimia ornata</i> <i>Lichtheimia ramosa</i> <i>Lichtheimia corymbifera</i>
	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Ascomtablaycota	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> ss <i>Aspergillus fumigati affinis</i> <i>Aspergillus lentulus</i> <i>Aspergillus calidoustus</i> <i>Aspergillus terreus</i> ss <i>Aspergillus alabamensis</i>
	<i>Candida</i>	<i>Candida albicans</i> ss (including <i>C. stellatoidea</i> , <i>C. africana</i>) <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida glabrata</i> ss <i>Candida bracarensis</i> <i>Candida nivariensis</i> <i>Candida parapsilosis</i> ss <i>Candida metapsilosis</i> <i>Candida orthopsilosis</i>
	<i>Coccidioides</i>	<i>Coccidioides immitis</i> ss <i>Coccidioides posadasii</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i>
	<i>Exophiala</i>	<i>Exophiala jeanselmei</i> ss <i>Exophiala xenobiotica</i> <i>Exophiala oligosperma</i>
	<i>Pneumocystis</i>	<i>Pneumocystis jiroveci</i>
	<i>Scedosporium</i>	<i>S. apiospermum</i> <i>S. aurantiacum</i> <i>S. prolificans</i>
	Basidiomycota	<i>Cryptococcus</i>
<i>Malassezia</i>		<i>Malassezia furfur</i> ss <i>Malassezia globosa</i> <i>Malassezia restricta</i>
<i>Trichosporon</i>		<i>Trichosporon asahii</i> <i>Trichosporon asteroides</i> <i>Trichosporon cutaneum</i> <i>Trichosporon inkin</i> <i>Trichosporon mucoides</i> <i>Trichosporon ovoides</i>

Los hongos que con mayor frecuencia se aíslan en los pacientes con FQ son *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*. *Candida spp* y en concreto *C.albicans* se aísla en estos pacientes entre un 50-75% de los casos y se considera comensal inofensivo desconociéndose su implicación en el deterioro de la función pulmonar. *Aspergillus spp* y sobre todo *Aspergillus fumigatus* aparece en el 25% de los pacientes con FQ (41). Otros hongos detectados en el tracto respiratorio con relativa frecuencia y con significado incierto son *Scedosporium aptospermum*, *Wantella dermatitidis* y *Penicillium emersonil*.

El género *Candida*, *Aspergillus* y *C. neoformans* son considerados patógenos fúngicos oportunistas. En la mayoría de los casos estos microorganismos pueden desarrollarse como colonizadores benignos o saprófitos ambientales que únicamente causan una infección grave ante una deficiencia en las defensas (40).

Género Candida

Las especies del género *Candida*, son células levaduriformes ovaladas que forman yemas, y producen pseudohifas o hifas verdaderas. En condiciones in vitro, dan lugar a colonias lisas de color blanco o crema. Se ha detectado su presencia en seres humanos, animales, en el aire, el agua y el suelo. Se han descritos más de 100 especies del género *Candida*, aunque tan sólo un pequeño número de ellas se han implicados en las infecciones clínicas. *C. albicans* es la especie aislada con una mayor frecuencia a partir de muestras clínicas, representa entre un 90-100% de los aislamientos de las muestras de mucosas, y entre un 50-70% de las cepas procedentes de pacientes con inmunosupresión. Alrededor de un 95% de estas últimas corresponde a cuatro especies: *C. albicans*, *C.glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. El 5% restante engloba entre 12 y 14 especies diferentes, como *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* y *C.*

rugosa. La frecuencia de aislamiento de cada especie varía considerablemente en función de la edad del paciente y la situación local, regional o global(40).

Género *Aspergillus*

Las especies del género *Aspergillus*, se desarrollan como miceliales. Al examen macroscópico pueden ser negras, marrones, verdes, amarillas, blancas o de otro color en función de la especie y de las condiciones del crecimiento. Está ampliamente distribuido en el medio ambiente y es muy difícil establecer medidas preventivas para evitar la exposición a sus esporas.

La prevalencia de *Aspergillus* en muestras respiratorias de los pacientes con FQ, varía desde el 6 al 57% dependiendo de la edad (suele aparecer durante la adolescencia), el lugar de residencia (afecta más a pacientes del medio rural) o las condiciones climáticas (mayor incidencia en zonas costeras). En aproximadamente el 75% de los casos persiste en cultivos sucesivos y su aislamiento normalmente representa colonización pulmonar. La especie mayoritaria es *A. fumigatus*. En el 2-10% de los pacientes la principal complicación es las Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), una hipersensibilización a los antígenos de *Aspergillus* con estimulación de la respuesta inmune celular y producción de anticuerpos específicos (36).

Género *Pneumocystis*

Pneumocystis jirovecii, conocido anteriormente como *Pneumocystis carinii* sp. *F. hominis*, es un hongo atípico, ubicuo que se clasifica dentro del filo *Ascomycota*(40,42).Las vías respiratorias representan la principal puerta de entrada de *P. jirovecii* en el ser humano. Este hongo tiene gran tropismo pulmonar, cuyo mecanismo de transmisión más probable es el transporte de partículas por el aire(40).

P.jirovecii presenta una tasa de colonización que oscila entre 7,4%- 20,6% en función de la técnica empleada para su identificación(43,44). No obstante, existen estudios en los que se observa que la tasa de colonización está influenciado por las condiciones climáticas(45).

Aunque se considera un hongo patógeno oportunista para humanos causantes de neumonías en pacientes inmunodeprimidos como los pacientes infectados por el VIH o trasplantados de órganos sólidos, no es infrecuente encontrarlo en pacientes inmunocompetentes, con alguna alteración como la FQ, como colonizadores(46). En la actualidad existe la hipótesis que la colonización por *P.jirovecii*, provoca obstrucción e inflamación de la vía aérea, sin embargo, no ha sido aprobada aún(47).

Género Scedosporium

Scedosporium (originalmente llamado *Pseudallesheria*) es un hongo filamentosos hialino también conocido como hialohifomicetos, que pertenece al filo *Ascomycota*. Este hongo crece formando colonias pilosas, grises y marrones. *Scedosporium apiospermum* y *Scedosporium prolificans* son los representantes más frecuentes de su género(40). *S. apiospermum* es un hongo de distribución mundial que puede cultivarse a partir de muestras procedentes del suelo, tierra de macetas, alcantarillas, aguas estancadas, arroyos y estiércol. *S. prolificans* se encuentran en cultivos de muestras de suelo y tierra de macetas. *Scedosporium* coloniza fácilmente la vía aérea dañada y las lesiones residuales de pulmón. Así, en situaciones de aumento de inmunosupresión o de tratamiento con corticoides, es fácil que se pase de una colonización a una enfermedad invasora(48). En algunos estudios de pacientes con FQ realizados en Australia y algunos países de Europa han confirmado la emergencia de este género que causa infecciones en los pulmones de huéspedes inmunocomprometidos(49,50). *Scedosporium* ha

sido aislado en el 14,7-17,4% de los pacientes australianos con FQ, siendo el segundo hongo patógeno más frecuente asociado a la FQ(49).

Una diferencia entre *S. apiospermum* y *S. prolificans* es la resistencia al tratamiento antifúngico. *S. apiospermum* es resistente a anfotericina B y sensible a voriconazol. En cambio *S. prolificans* es resistente a casi todos los fármacos antifúngicos(40,48).

Técnicas moleculares

Las técnicas de cultivo convencionales que se utilizan de manera rutinaria sólo permiten la identificación de una pequeña parte de la microbiota. Como alternativa a estos métodos, se han desarrollado técnicas moleculares que pueden identificar microorganismos difíciles de identificar o no cultivables, mediante cultivo convencional(51,52). Formando parte de estas nuevas técnicas se encuentran técnicas de hibridación mediante sondas (Southern blot, Northern blot, Dot blot, Slot-blot), microarray, la secuenciación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simple y sus variantes como la PCR a tiempo real o cuantitativa (PCR-TR), PCR anidada, PCR-DGGE (por sus siglas en inglés, polymerase chain reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), PCR transcriptasa inversa, PCR de extensión solapada, entre otras. Estos métodos están basados en el análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) de los microorganismos, ya sean hongos, bacterias, virus, viroides y nematodos y han sido empleados en las muestras respiratorias de pacientes con FQ en algunos estudios(51,53) permitiéndonos conocer una mejor visión de la microbiota.

Entre el conjunto de nuevas herramientas moleculares que tenemos a disposición hoy en día, la que parece tener mayor proyección de futuro es la

metagenómica. Está basada en la secuenciación masiva de todos los fragmentos de ADN de una muestra, y un tratamiento informático posterior que identifica los "contigs" (también llamados conjuntos de secuencias) y los anota de forma que obtenemos la secuencia completa de todos los microorganismos presentes en la muestra.

Debido a la incorporación de estos métodos moleculares, en diferentes estudios para la identificación de microorganismos de la vía aérea, sabemos que las exacerbaciones infecciosas en los pacientes con fibrosis quística son producidas por flora polimicrobiana(54). Sin embargo, aún queda pendiente por resolver la incógnita, sobre el papel que juegan las especies del reino Hongos, sobre la función pulmonar y el estado clínico de los pacientes.

El aislamiento de hongos en el esputo de los pacientes con FQ, es cada vez más común, sin embargo, no siempre son identificados con los medios de cultivos tradicionales. Aprovechando los nuevos avances en la ciencia como es el uso cada vez más extendido de técnicas que aíslan material genético, se ha realizado esta tesis, con el fin de detectar en esputo, que porcentaje y tipos de hongos son aislados, así como conocer qué relación existe entre la presencia de hongos y las características clínicas y funcionales de los pacientes de forma evolutiva.

Hipótesis y Objetivos.

Hipótesis

El estudio del esputo espontáneo de pacientes adultos y niños con FQ no trasplantados mediante técnicas de metagenómica constituye una técnica eficaz para el estudio de la microbiota fúngica de estos pacientes que se relaciona con parámetros clínicos.

Objetivos

OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Identificar la microbiota fúngica presente en el esputo espontáneo de pacientes con FQ no trasplantados y mayores o igual a 6 años mediante el estudio metagenómico.
2. Estudiar la posible relación entre los resultados obtenidos por las técnicas moleculares y los parámetros clínicos y biológicos de evolución de la enfermedad.

OBJETIVOS SECUNDARIOS.

1. Identificar por cultivo convencional y mediante la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR-DGGE, los hongos presentes en las secreciones respiratorias de pacientes FQ no trasplantados mayores de 6 años.
2. Analizar la concordancia entre la identificación convencional y la biología molecular.

3. Relacionar la colonización fúngica con otros microorganismos presentes, así como la presencia de coinfecciones.
4. Analizar la relación de los hongos identificados, con la evolución de los parámetros de la función respiratoria y respuestas alérgicas asociadas, así como con las mutaciones presentes en CTFR.

Método.

Diseño y Población en estudio

Para cubrir los objetivos planteados se realizó un estudio observacional de cohortes prospectivas. Se incluyeron 68 pacientes diagnosticados de FQ mayores de 6 años, en seguimiento por la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital universitario Virgen del Rocío, de Sevilla. Estos pacientes cumplían todos los criterios de inclusión establecidos para el estudio.

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

- Pacientes diagnosticados de FQ, con 2 test del sudor positivos (> 60mmol/l) o un estudio genético confirmando las dos mutaciones del gen de la proteína CFTR.
- Posibilidad de obtener una muestra respiratoria (esputo espontáneo)

Criterios de exclusión:

- Aquellos pacientes que presentaran una exacerbación respiratoria en el momento de reclutamiento o en las 4 semanas previas. Se utilizó para la definición de exacerbación respiratoria los criterios de Fuchs (14).
- Pacientes menores de 6 años.
- Pacientes en tratamiento con inmunosupresores.
- Paciente con trasplante de órgano sólido previo a la inclusión del estudio.
- Pacientes con datos analíticos o funcionales incompletos previos.
- Posibilidad de pérdida de seguimiento semestral o anual del paciente.

Parámetros evaluados

A todos los pacientes incluidos se les hizo un seguimiento durante un año, con tres visitas. La visita basal que coincidía con la inclusión del paciente en el estudio, la semestral y la anual. Todos los datos recogidos, fueron incluidos a un cuaderno de recogida de datos (CRD), el cual se muestra en el anexo 1.

En la visita basal (visita 1), además de la firma del consentimiento informado, fueron recogidos los siguientes datos:

- Datos epidemiológicos: sexo, edad y año de nacimiento.
- Datos clínicos: índice de masa corporal (IMC Kg/m²), mutación detectada en el gen de la CFTR mediante un test genético, niveles de inmunoglobulina E (IgE), comorbilidades asociadas a la fibrosis quística, tratamiento antibiótico recibido en el año previo a la inclusión del estudio (tanto antibioterapia oral como intravenosa), tratamiento con corticoides orales, intravenosos e inhalados. Se evaluó la colonización crónica e intermitente de la vía aérea por microorganismos cultivables.
- Datos funcionales: capacidad vital forzada (FVC), volumen espirado en el primer segundo (FEV₁) y cociente FEV₁/ FVC, medidos por espirometría forzada post-broncodilatación.
- Datos analíticos con un margen de +/- 3 meses: Hemoglobina, creatinina sérica, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, IgE Total, Ig *Aspergillus fumigatus*, Ig m³ *Aspergillus fumigates* y *Aspergillus* IFI.
- Índice radiológico BHALLA: sistema de clasificación del daño pulmonar en pacientes con FQ, siendo la máxima puntuación de 25, y la mínima de 0, indicando un mayor daño del parénquima pulmonar a menor puntuación obtenida.

- Muestras microbiológicas: las muestras de esputo son analizadas mediante dos aproximaciones metodológicas, el cultivo de esputo convencional, y las determinaciones moleculares (en este caso con la PCR y posterior secuenciación genómica).

A los 6 meses de seguimiento (visita 2) los datos que se recogieron fueron:

- Datos clínicos: IMC Kg/m², nuevas comorbilidades asociadas a la FQ y colonización crónica e intermitente de la vía aérea.
- Datos funcionales: FVC, FEV₁, cociente FVC/FEV₁.
- Datos analíticos con un margen de +/- 3 meses: Hemoglobina, creatinina sérica, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, IgE Total, IgG *Aspergillus fumigatus*, IgE m³ *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus* IFI.
- Muestra de esputo, analizados con las mismas técnicas que en la visita 1.

En la visita anual (visita 3), se recogen de nuevo:

- Datos clínicos: IMC Kg/m², nuevas comorbilidades, números de exacerbaciones, tratamientos antibióticos recibidos y colonización crónica e intermitente de la vía aérea.
- Datos funcionales: FVC, FEV₁, cociente FVC/FEV₁.
- Datos analíticos con un margen de +/- 3 meses: Hemoglobina, creatinina sérica, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, IgE Total, IgG *Aspergillus fumigatus*, IgE m³ *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus* IFI.
- Muestra de esputo

Las comorbilidades recogidas, son las relacionadas con la FQ como: la intolerancia a la glucosa, la diabetes mellitus relacionada con la FQ (DMRFQ), la insuficiencia pancreática exocrina y la hepatopatía secundaria a la FQ.

La colonización crónica se definió como la presencia de cultivos positivos persistentes, al menos 3 cultivos positivos en 6 meses, con al menos un mes de separación entre sí. Se define colonización intermitente a la presencia de cultivos intermitentemente positivos y negativos en muestras consecutivas en un período de 6 meses a partir de la colonización inicial, al menos 3 cultivos espaciados en un mes entre ambos(55).

Las espirometrías realizadas durante el seguimiento de estos pacientes fueron efectuadas con el espirómetro Power Unit JAEGER, Lab Manager V5.3.0 y seguían las recomendaciones internacionales(56).

Variables de estudio

- Análisis de la microbiota fúngica del esputo espontáneo de pacientes con FQ ≥ 6 años y no trasplantados, mediante metagenómica.
- Cultivo convencional para hongos del esputo espontáneo de los pacientes con FQ.
- Identificación de *P. jirovecii* mediante PCR a tiempo real del gen mt LSU rRNA en esputo espontáneo de pacientes con FQ al inicio del estudio, a los 6 y 12 meses.
- Identificación de especies fúngicas mediante PCR tipo Nested y posterior secuenciación en el esputo espontáneo de pacientes con FQ al inicio del estudio, a los 6 y 12 meses.
- Características clínicas, funcionales y radiológicas de los pacientes con FQ.

Aspectos éticos

El estudio respetaba los principios éticos recogidos en la última revisión de la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de investigación clínica del centro (acta número 06/2009).

Previo a la participación, tras ser explicado y entendido el estudio, los pacientes o el tutor legal en caso de menores de edad, firmaron un consentimiento informado aceptando la participación en dicho estudio. El consentimiento informado utilizado se aporta en el anexo 2. La información recogida se anotaba en CRD, que posteriormente era transcrito a una base de datos.

La información recogida para la realización de esta tesis cumplía con la legislación de protección de datos (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal). Tanto en el CRD como la base de datos estaban bajo la custodia de la doctoranda y en ellos no se recogían datos que permitían identificar al paciente.

Técnica de extracción de esputo

Las muestras se debían recoger en la primera hora de la mañana. Se consideraba que una muestra era adecuada cuando al teñirla con tinción de Gram se observaban > 25 leucocitos y < 10 células epiteliales.

Las tres muestras de esputo fueron recogidas en las sucesivas visitas, es decir, basal al inicio del estudio, a los 6 y 12 meses, y fueron numeradas sucesivamente con el orden cronológico de recogida.

- Para la recogida del esputo, los pacientes debían de seguir los siguientes pasos:
- Enjuagar la boca con agua antes de emitir la muestra.

- Inspirar dos veces profundamente, conteniendo el aliento durante unos segundos. Inspirar por tercera vez y expulsar el aire vigorosamente. Inspirar una vez más y luego toser. Con estas maniobras se intenta recoger un esputo que provenga de la vía aérea inferior.
- Sostener el envase estéril cerca de los labios y depositar la muestra.
- Se entregaba la muestra de esputo en la Unidad de Fibrosis Quística. Se conservaba en la nevera, a 4°C si el procesamiento no es inmediato hasta su recepción en el laboratorio.

Las muestras de esputo se recogieron por duplicado en condiciones de asepsia para evitar contaminantes. Se dividieron en alícuotas de 500 µL y se envió una muestra al Servicio de Microbiología del HUVR y la otra muestra se remitió en paralelo al laboratorio de Epidemiología Clínica y Molecular, del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) donde se mantuvo criopreservada a -20°C hasta su posterior análisis.

Identificación de microorganismos por métodos estandarizados

El cultivo de las muestras respiratorias fue realizado en el Servicio de Microbiología, del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Previo al cultivo, las muestras respiratorias deben de someterse, debido a su elevada consistencia a un procesamiento, para que el cultivo sea lo más efectivo posible (36).

- Homogeneización de la muestra: habitualmente se emplean agentes mucolíticos (N-acetilcisteína) o ditiotreitól. El tiempo de contacto entre estos productos y el esputo previo a la siembra no debe ser prolongado ya que pueden inhibir o retrasar el crecimiento de diferentes patógenos. Para evitar esta acción deletérea también se ha recomendado emplear

una homogeneización mecánica (sonicación suave) o utilizar simplemente suero salino.

- Se recomienda una incubación de al menos 48 horas; las primeras 24 horas a 35-37°C y posteriormente a 30°C para facilitar el crecimiento de posibles bacilos Gram-negativos no fermentadores.
- El cultivo microbiológico de las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ debe incluir medios generales y selectivos-diferenciales para los patógenos habituales y una incubación más prolongada que la que se realiza con las muestras de otros pacientes. La inclusión de estos medios facilita la recuperación de patógenos que se encuentren en baja proporción, sobre todo en los casos en los que exista una colonización simultánea con *P. aeruginosa* que puede ocultar su crecimiento. (Tabla 3)

Identificación de microorganismos mediante técnicas moleculares

Las técnicas moleculares empleadas en la realización de este trabajo fueron realizadas en el laboratorio de Epidemiología Clínica y Molecular, del Instituto de Biomedicina de Sevilla y la secuenciación en el laboratorio de Secuenciación de dicho centro.

Digestión de las muestras

El proceso de digestión es aquel mediante el cual conseguimos que el material genético quede accesible, realizándose este paso previo a la extracción de ADN. Para realizar la digestión se añadió a cada alícuota de 500 µl, 5 µl de ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 5M a pH 8 como agente quelante de iones bivalentes, 15 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% (que actúa como detergente iónico que ayuda a disgregar las membranas) y 45 µl proteinasa K, enzima que lleva a cabo la digestión, a una concentración de 14mg/ml. Las muestras se incubaron al menos 12 horas en un baño termostático con

agitación constante (GRANT GSL Acua 12 plus) a 56°C, siendo esta la temperatura a la que la eficiencia de proteínasa K es máxima.

Tabla 3. Medios de cultivo recomendables, condiciones óptimas de incubación y objetivos de los mismo. Modificada de Oliver A et al (36).

Medio de cultivo	Condiciones de incubación	Comentario
Agar sangre	35°C 48h o 35°C 24h + T° ambiente 24h	Crecimiento de microbiota habitual. <i>P.aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. pneumoniae</i> Puede prolongarse su incubación en condiciones adecuadas de humedad hasta 5-7 días para el aislamiento de <i>Nocardia spp.</i>
Agar chocolate	35°C 48h, CO ₂	Objetivo: <i>H. influenzae</i> Si existe colonización por <i>P. aeruginosa</i> se recomienda incubar en anaerobiosis o sustituir este medio por agar chocolate suplementado con bacitracina y colistina.
Agar manitol-sal	35°C 48h	Medio selectivo diferencial para <i>S. aureus</i>
Agar MacConkey	35°C 48h o 35°C 24h + T° ambiente 24h	Medio selectivo diferencial para bacilos gran negativos, incluyendo <i>P. aeruginosa</i>
Saboraud ±cloranfenicol±actidiona	35°C y 30°C, hasta 4 semanas	Medios selectivos para el crecimiento de hongos
Löwestein Jensen o Coletsos y medios líquidos selectivos de enriquecimiento	35°C, hasta 4 semanas	Objetivo: aislamiento de micobacterias. Debe realizarse una descontaminación previa de la muestra.

Extracción del ADN

Tras la digestión de las muestras se lleva a cabo la extracción del ADN. El ADN genómico se aisló mediante cromatografía de adsorción en columnas con el Kit comercial (Nucleospin tissue, Macherey & Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Alemania) que se muestra en el Anexo 3. Al aplicar este protocolo se favorece la

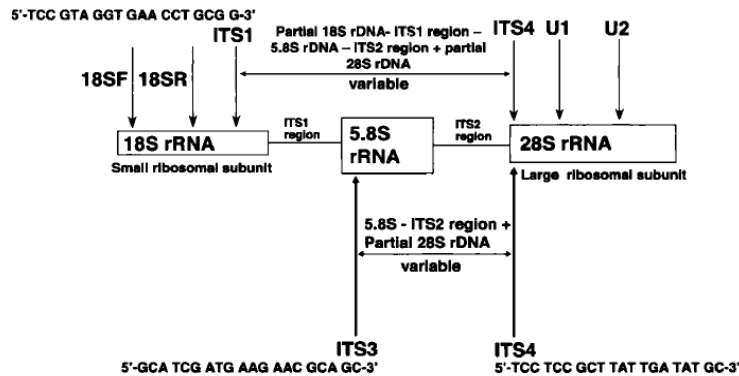
adsorción de las moléculas de ADN en la membrana de sílica de la columna. El ADN se purifica mediante soluciones que arrastran sales, proteínas y otros productos de la digestión celular y posteriormente se eluye el ADN rehidratando la membrana de la columna. Finalmente se obtuvieron eppendorf con un volumen de 55 µl de agua destilada que contenían el ADN eluido y que fueron almacenados a -20° C hasta su análisis.

Técnicas de amplificación

Identificación molecular de la microbiota fúngica: La identificación de la microbiota fúngica se realizó mediante la amplificación del gen específico de hongos ITS (del inglés Internal Transcribed Spacers) mediante PCR tipo semi Nested (también conocida como PCR anidada) y posterior secuenciación directa para las poblaciones aisladas o clonación en caso de la obtención de más de un hongo.

Para la amplificación del gen ITS, se realizaron dos rondas consecutivas de PCR, empleando para ello diferentes cebadores en cada parte. En la primera ronda de amplificación se utilizaron los cebadores ITS-1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') Estos cebadores flanquean una región entre 500 y 800 pb (pares de bases) del genoma de diferentes hongos. Posteriormente se realizó una segunda ronda de amplificación con la utilización de los cebadores ITS-1 e ITS-3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') que amplifican una región de 200-500pb. (Figura 8).

Figura 8. Cebadores utilizados para la identificación de diferentes ITS de hongos. (54).



En la preparación de la primera mezcla de reacción se utilizaron 132 µl de H₂O, 20 µl de reacción Buffer 10x (Bioline), 10 µl de MgCl₂, 4 µl de cada cebador (concentración de 20 µM), 4 µl de nucleótidos trifosfato y 1,6 µl de Taq (BioTaq ADN pol. 5U/mcl de Bioline), siendo añadidos en este orden consecutivo. El volumen final fue de 25 µl (3 µl de ADN total) para la primera ronda. La segunda mezcla se preparó con 213 µl de H₂O, 32 µl de reacción Buffer, 16 µl de MgCl₂, 8 µl de cada cebador, 8 µl de dNTP (nucleótido trifosfato), y 2,4 µl de Taq (BioTaq ADN pol. 5U/mcl de Bioline), con un volumen final de 40 µl (4 µl de la primera PCR) para la segunda ronda. Respetándose el orden de incorporación de los productos a la mezcla.

Ambas amplificaciones se llevaron a cabo en el T3000 Thermocycler (Biometra), siguiendo programas distintos para la primera y la segunda ronda, tal como se muestra en la Tabla 4 y

Tabla 5.

Los productos de PCR obtenidos se incluyeron en gel de agarosa al 2%, que contenía bromuro de etidio, visualizándose las bandas con el Transiluminador.

Posteriormente, se prepararon los fragmentos amplificados obtenidos para secuenciación.

Tabla 4. Programa de la PCR semi-nested para el gen ITS: primera ronda

Etapa	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación	1	95	5 minutos
Desnaturalización	35	94	30 segundos
Hibridación		55	45 segundos
Extensión		72	30 segundos
Terminación	1	72	7 minutos

Tabla 5. Programa de la PCR semi-nested para el gen ITS: segunda ronda

Etapa	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación	1	95	5 minutos
Desnaturalización	40	94	45 segundos
Hibridación		55	45 segundos
Extensión		72	45 segundos
Terminación	1	72	7 minutos

Previo a la secuenciación se realizaron algunos pasos intermedios, en función de las características de los fragmentos obtenidos, con el fin de obtener una muestra con la mejor calidad posible. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- En caso de identificación de varios fragmentos que no se separaban entre sí por su similar tamaño durante la electroforesis, se realizó la clonación.
- Si los fragmentos tenían diferentes pesos moleculares, tanto como para separarse en el gel más de 50 pb, se añadían a un gel de agarosa. Las bandas obtenidas, se cortaban con un bisturí y se purificaban.
- Cuando en las muestras solo se amplificó un fragmento se realizó la purificación, ya que se considera que ese fragmento contenía una única especie fúngica.

Identificación molecular de *Pneumocystis jirovecii*: La detección de *P. jirovecii* se realizó mediante la técnica de PCR a tiempo real (PCR-TR). La mezcla de reacción se hizo a un volumen final de 20 µL, con los cebadores pAZ102-X (5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAG G-3') y pAZ102-Y (5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3') a una concentración de 250 nM cada uno, MgCl₂ 1mM y partiendo de 2 µl de ADN de la muestra. Los equipos usados para llevar a cabo esta técnica son el equipo LightCycler 1.5 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) y el LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

El programa empleado para la realización de la PCR-TR, requería unas condiciones adecuadas, que se explican en la Tabla 6.

Mediante la sonda inmunofluorescente SYBR Green I, que emite fluorescencia cuando se une a la doble cadena de ADN, se detectó el producto de amplificación. Se consideraron positivas las muestras cuyas dos alícuotas amplificaron antes del ciclo 35 y presentaban una temperatura de “melting”

(temperatura de fusión) entre 77 y 81°C. Descartando la amplificación inespecífica de dímeros de cebador entre 72-75°C.

La identificación molecular de polimorfismos en las posiciones 85 y 248 del gen mt LSU rRNA de *P. jirovecii* se realizó mediante secuenciación directa precedida de la purificación del fragmento y su precipitación. Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó el software de Macintosh Sequence Navigator v.1.0.1. de PE-Applied Biosystems.

Tabla 6. Programa para la PCR-TR para mtLSR rRNA.

Etapa	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación	1	95	8 minutos
Desnaturalización	40	95	5 segundos
Hibridación		55	15 segundos
Extensión		72	10 segundos
Terminación	1	76	1 segundo

Técnica de Clonación

La clonación se realizó en aquellos fragmentos que no se separaban en el gel de agarosa por poseer un peso molecular parecido. El proceso de clonación se realiza siguiendo los siguientes pasos:

- **Ligación:** El procedimiento de ligación se emplea cuando se quiere introducir un fragmento de ADN de doble cadena deseado, en un vector. Un vector no es más, que una molécula de ADN que actúa como vehículo para transferir material genético a una célula y replicarse en esta.

- **Transfección o transformación:** Es la reacción en la que el vector con el gen de interés es introducido a una célula huésped, que le proporcionará la maquinaria enzimática necesaria para la replicación.
- **Selección:** en este proceso se selecciona las colonias de células que han sido exitosamente transfectadas con el vector que contiene el gen deseado. Los vectores actuales incluyen marcadores que solo permite el crecimiento de las células a las que se le ha introducido el vector. Posteriormente las células son cultivadas.

Técnica de Secuenciación

El fundamento de esta técnica se basa en obtener fragmentos de amplificación cuyo tamaño difiere una sola base, a partir de un molde de ADN. Se consigue esta reacción al incorporar una cadena de ADN, un cebador, una ADN polimerasa y nucleótidos marcados con fluorescencia, que al incorporarse al final de la cadena (extremo 3') producen la terminación del fragmento. Los nucleótidos terminales empleados llevan cuatro tipos distintos de marcaje, por lo que se puede llevar a cabo en el mismo tubo las cuatro reacciones de terminación específica (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). De esta forma se determina cuál es el nucleótido terminal de los fragmentos de ADN en función de su señal y resolver la secuencia con un solo carril.

Posteriormente, se realiza una precipitación para eliminar los reactivos sobrantes de la reacción y otras moléculas que puedan interferir en la lectura del secuenciador.

Las secuencias obtenidas, se comparan con secuencias que habían sido incluidas en la base de datos de PubMed, para identificar a que hongo correspondía en cada caso. Para buscar la concordancia entre las secuencias

que habíamos obtenido de nuestras muestras y las secuencias descritas en la base de datos, se recurrió a la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se utilizó el programa Nucleotide Blast que nos permitía buscar una base de datos de nucleótidos utilizando nuestra secuencia de nucleótidos como patrón de búsqueda. Tras introducir nuestra secuencia en formato FASTA, filtramos la búsqueda evitando aquellas secuencias que pertenecen a humanos o ratón y seleccionamos la opción búsqueda de Megablast, con la cual conseguimos rastrear aquellas secuencias que eran altamente similares a la nuestra.

Controles de calidad

Las muestras se procesaron en el laboratorio a ciegas y bajo código. Para evitar falsos positivos debido a contaminaciones, en todas las etapas se utilizaron puntas de pipeta con filtro.

La extracción de ADN, preparación de la mezcla de reacción, amplificación por PCR y detección se efectuaron en distintas áreas. Para detectar la posible contaminación cruzada, todas las reacciones de PCR llevaban como control negativo H₂O estéril.

En los procesos de digestión de muestras se usó como control negativo de posible contaminación suero fisiológico.

Método estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el Statistical Package for Social Sciences (SPSS INC. IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE.UU) versión 23. Los resultados se han expresado como medias y desviación estándar (DS) para las variables cuantitativas, y mediante las frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas, expresando las desviaciones estándar o los porcentajes

entre paréntesis. Las relaciones bivariantes entre variables se realizarán mediante el test de la Chi-cuadrado para variables categóricas y con la t de Student para variables independientes previa realización del test de Levene para evaluar la igualdad de las varianzas.

El estudio del grado de concordancia entre ambas técnicas (convencional y metagenómica) para el cultivo de hongos (objetivo 2) se estimará mediante la construcción de tablas de contingencia 2x2 para cada una de las visitas excluyendo los casos sin resultados y el cálculo del coeficiente Kappa de Cohen.

El coeficiente kappa es una herramienta estadística frecuentemente utilizada para determinar el grado de concordancia inter-observador. Este coeficiente corresponde proporción de concordancias observadas sobre el total de observaciones, habiendo excluido las concordancias atribuibles al azar. Puede tomar valores entre -1 y +1. Mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia inter-observador, por el contrario, mientras más cercano a -1, mayor es el grado de discordancia inter-observador. Un valor de $\kappa = 0$ refleja que la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar(57).

Además, se estudió el perfil diagnóstico de las técnicas convencionales tomando como estándar de referencia a las técnicas metagenómicas. Se estimarán la prevalencia, sensibilidad, especificidad, proporción de falsos positivos, proporción de falsos negativos, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

La relación entre los cambios en los resultados de la metagenómica y las variables clínicas registradas se estudiaron mediante el test de ANOVA, previa realización de la prueba de Levene para evaluar la igualdad de las varianzas,

aplicándose el test de Welch en su lugar si éstas no eran homogéneas. Además, se aplicó la corrección de Bonferroni para detectar diferencias inter-grupos. La comparación de las variables cuantitativas entre los grupos de evolución temporal de la metagenómica se realizó con el test de al Chi-cuadrado, realizando estudios pareados por categorías para explorar las diferencias intra-grupos.

Resultados.

Descripción de la muestra

La cohorte se compuso de 68 pacientes diagnosticados de FQ. Como se refleja en la

Tabla 7. Características de la población.

Grupo	Característica	Valor promedio*
Datos clínicos	Edad (años)	21,5 (9,7)
	Sexo (hombres)	30 (44,1)
	No fumadores	68 (100)
	No bebedor	68 (100)
	Índice de masa corporal (kg/m ²)	19,2 (3,2)
	Índice BHALLA	14,7 (5,9)
	Exacerbaciones año previo	3 (2)
	Ciclos de antibióticos año previo	3,2 (2,3)
Mutaciones	Phe508del homocigoto	24 (35,3)
	Phe508del heterocigoto	28 (41,2)
	Gly542* homocigoto	0 (0)
	Gly542* heterocigoto	10 (14,7)
	Arg334Trp homocigoto	0 (0)
	Arg334Trp heterocigoto	9 (13,2)
	Otras	7 (10,3)
Comorbilidades	Insuficiencia pancreática exocrina	46 (67,6)
	DMRFQ	10 (14,7)
	Intolerancia a la glucosa	32 (47,1)
	Hepatopatía asociada a la FQ	12 (17,6)
	Aspergilosis broncopulmonar alérgica	3 (4,4)

	Otras comorbilidades	18 (26,5)
--	----------------------	-----------

*Datos expresados en media (desviación estándar) y en frecuencias absolutas (relativas) según la naturaleza de la variable.

Tabla 8. Pruebas complementarias basales de la población estudiada.

Grupo	Característica	Valor promedio*	
Pruebas funcionales	FVC (ml)	2623 (1108)	
	FVC (%)	78,6 (22,7)	
	FEV ₁ (ml)	1671 (845)	
	FEV ₁ (%)	59,6 (24,7)	
	FEV ₁ /FVC	62 (11)	
Pruebas analíticas	IgE Total (KU/l)	455 (938)	
	IgE m ³ <i>Aspergillus fumigatus</i> (KUA/l)	9,6 (22,3)	
	IgG <i>Aspergillus fumigatus</i> (mgA/l)	53,7 (38,8)	
	Aspergillus IFI	Negativo	4 (5,9)
		1/64	14 (20,6)
		1/128	16 (23,5)
		1/256	14 (20,6)
		1/512	7 (10,3)
		1/1024	5 (7,4)
		1/2048	1 (1,5)
		Hemoglobina (g/dl)	13,8 (1,2)
	Leucocitos (x10 ⁹ /l)	8,9 (2,8)	
	Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	5,3 (2,4)	
Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,3 (0,1)		
Creatinina (mg/dl)	0,6 (0,2)		

*Datos expresados en media (desviación estándar) y en frecuencias absolutas (relativas) según la naturaleza de la variable.

Tabla 9. Colonizaciones basales en el año previo de la población estudiada.

	Microrganismo	Colonización intermitente*	Colonización crónica*
Bacterias	<i>S. aureus MS</i>	18 (26,5)	15 (22,1)
	<i>S. aureus MR</i>	4 (5,9)	7 (10,3)
	<i>P. aeruginosa</i>	19 (27,9)	29 (42,6)
	<i>P. aeruginosa resistente</i>	0 (0)	1 (1,5)
	<i>Serratia sp.</i>	3 (4,4)	2 (2,9)
	<i>S. maltophilia</i>	6 (8,8)	0
	<i>S. pneumoniae</i>	2 (2,9)	0
	<i>H. influenzae</i>	13 (19,1)	0
	<i>B. Cepaceae</i>	9 (13,2)	2 (2,9)
	<i>A. xylosoxidans</i>	6 (8,8)	0
	Otras bacterias	17 (25,3)	1 (1,5)
Hongos	<i>Aspergillus</i>	19 (27,9)	1 (1,5)
	<i>Candida</i>	23 (33,8)	0
	<i>Levaduras</i>	9 (13,2)	1 (1,5)
	Otros hongos	9 (13,3)	0

*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). MR: meticilín-resistente.

MS: meticilín-sensible.

Los tratamientos basales en los 6 meses previos de la población estudiada están resumidos en la Tabla 10. Continuando con el tratamiento realizado por los pacientes de la cohorte, los 6 meses previos al ingreso del estudio, observamos que 25 (36,8%) casos tomaban corticoides inhalados (budesonida y fluticasona) unos 173 (± 33 DS) días, a dosis media de 752 ($\pm 545,5$ DS) μg . Solo 1 (1,5%) caso tomó corticoides orales de forma puntual. Respecto al tratamiento antibiótico oral, fue usado en 58 (85,3%) casos de la población como tratamiento de una exacerbación infecciosa, siendo los antibióticos que con mayor frecuencia se usaron ciprofloxacino (52,9%), cefuroxima axetilo (48,5%), cotrimoxazol (30,9%) y amoxicilina clavulánico (25%) como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** La azitromicina por vía oral fue empleada en 29 (42,6%) casos de los pacientes con efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, siendo administrada tres veces por semana.

El uso de antibioterapia intravenosa fue inferior a la oral, usada en 10 (14,7%) de los pacientes. Los fármacos más empleados fueron tobramicina (13,2%) y ceftazidima (14,7%). Otros tipos de antibióticos por vía intravenosa fueron usados con menor frecuencia como se registra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** La antibioterapia inhalada fue aplicada en 56 (82,4%) de los casos, siendo la más usada la colistina en 53 (77,9%) casos, frente a tobramicina con 3(4,4%) casos.

Tabla 10. Tratamientos basales en los 6 meses previos de la población estudiada.

Tratamiento	Valor promedio*
Corticoides inhalados	25 (36,8)

Corticoides orales	1 (1,5)
Antibiótico oral	58 (85,3)
Antibiótico inhalado	56 (82,4)
Antibiótico intravenoso	10 (14,7)
Azitromicina oral (3 veces por semana)	29 (42,6)

*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas).

, al final del seguimiento se perdieron un total de 22 pacientes, debidoprincipalmente a la ausencia demuestra de esputo suficiente para poder realizar el estudio molecular. Otros motivos de pérdida fueron el fallecimiento de un sujeto y la realización de trasplante pulmonar en otro paciente.

Las características clínicas de la muestra están descritas en la

Tabla 7. Características de la población.

Grupo	Característica	Valor promedio*
Datos clínicos	Edad (años)	21,5 (9,7)
	Sexo (hombres)	30 (44,1)
	No fumadores	68 (100)
	No bebedor	68 (100)
	Índice de masa corporal (kg/m ²)	19,2 (3,2)
	Índice BHALLA	14,7 (5,9)
	Exacerbaciones año previo	3 (2)
	Ciclos de antibióticos año previo	3,2 (2,3)
Mutaciones	Phe508del homocigoto	24 (35,3)
	Phe508del heterocigoto	28 (41,2)

	Gly542* homocigoto	0 (0)
	Gly542* heterocigoto	10 (14,7)
	Arg334Trp homocigoto	0 (0)
	Arg334Trp heterocigoto	9 (13,2)
	Otras	7 (10,3)
Comorbilidades	Insuficiencia pancreática exocrina	46 (67,6)
	DMRFQ	10 (14,7)
	Intolerancia a la glucosa	32 (47,1)
	Hepatopatía asociada a la FQ	12 (17,6)
	Aspergilosis broncopulmonar alérgica	3 (4,4)
	Otras comorbilidades	18 (26,5)

*Datos expresados en media (desviación estándar) y en frecuencias absolutas (relativas) según la naturaleza de la variable.

Tabla 8. Pruebas complementarias basales de la población estudiada.

Grupo	Característica	Valor promedio*
Pruebas funcionales	FVC (ml)	2623 (1108)
	FVC (%)	78,6 (22,7)
	FEV ₁ (ml)	1671 (845)
	FEV ₁ (%)	59,6 (24,7)
	FEV ₁ /FVC	62 (11)
Pruebas analíticas	IgE Total (KU/l)	455 (938)
	IgE m ³ <i>Aspergillus fumigatus</i> (KUA/l)	9,6 (22,3)
	IgG <i>Aspergillus fumigatus</i> (mgA/l)	53,7 (38,8)
	Aspergillus IFI Negativo	4 (5,9)

	1/64	14 (20,6)
	1/128	16 (23,5)
	1/256	14 (20,6)
	1/512	7 (10,3)
	1/1024	5 (7,4)
	1/2048	1 (1,5)
	Hemoglobina (g/dl)	13,8 (1,2)
	Leucocitos (x10 ⁹ /l)	8,9 (2,8)
	Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	5,3 (2,4)
	Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,3 (0,1)
	Creatinina (mg/dl)	0,6 (0,2)

*Datos expresados en media (desviación estándar) y en frecuencias absolutas (relativas) según la naturaleza de la variable.

Tabla 9. Colonizaciones basales en el año previo de la población estudiada.

	Microrganismo	Colonización intermitente*	Colonización crónica*
Bacterias	<i>S. aureus MS</i>	18 (26,5)	15 (22,1)
	<i>S. aureus MR</i>	4 (5,9)	7 (10,3)
	<i>P. aeruginosa</i>	19 (27,9)	29 (42,6)
	<i>P. aeruginosa resistente</i>	0 (0)	1 (1,5)
	<i>Serratia sp.</i>	3 (4,4)	2 (2,9)
	<i>S. maltophilia</i>	6 (8,8)	0
	<i>S. pneumoniae</i>	2 (2,9)	0
	<i>H. influenzae</i>	13 (19,1)	0
	<i>B. Cepaceae</i>	9 (13,2)	2 (2,9)

	<i>A. xylosoxidans</i>	6 (8,8)	0
	Otras bacterias	17 (25,3)	1 (1,5)
Hongos	<i>Aspergillus</i>	19 (27,9)	1 (1,5)
	<i>Candida</i>	23 (33,8)	0
	<i>Levaduras</i>	9 (13,2)	1 (1,5)
	Otros hongos	9 (13,3)	0

*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). MR: meticilín-resistente.

MS: meticilín-sensible.

Los tratamientos basales en los 6 meses previos de la población estudiada están resumidos en la Tabla 10. Continuando con el tratamiento realizado por los pacientes de la cohorte, los 6 meses previos al ingreso del estudio, observamos que 25 (36,8%) casos tomaban corticoides inhalados (budesonida y fluticasona) unos 173 (± 33 DS) días, a dosis media de 752 ($\pm 545,5$ DS) μ g. Solo 1 (1,5%) caso tomó corticoides orales de forma puntual. Respecto al tratamiento antibiótico oral, fue usado en 58 (85,3%) casos de la población como tratamiento de una exacerbación infecciosa, siendo los antibióticos que con mayor frecuencia se usaron ciprofloxacino (52,9%), cefuroxima axetilo (48,5%), cotrimoxazol (30,9%) y amoxicilina clavulánico (25%) como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** La azitromicina por vía oral fue empleada en 29 (42,6%) casos de los pacientes con efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, siendo administrada tres veces por semana.

El uso de antibioterapia intravenosa fue inferior a la oral, usada en 10 (14,7%) de los pacientes. Los fármacos más empleados fueron tobramicina (13,2%) y ceftazidima (14,7%). Otros tipos de antibióticos por vía intravenosa fueron

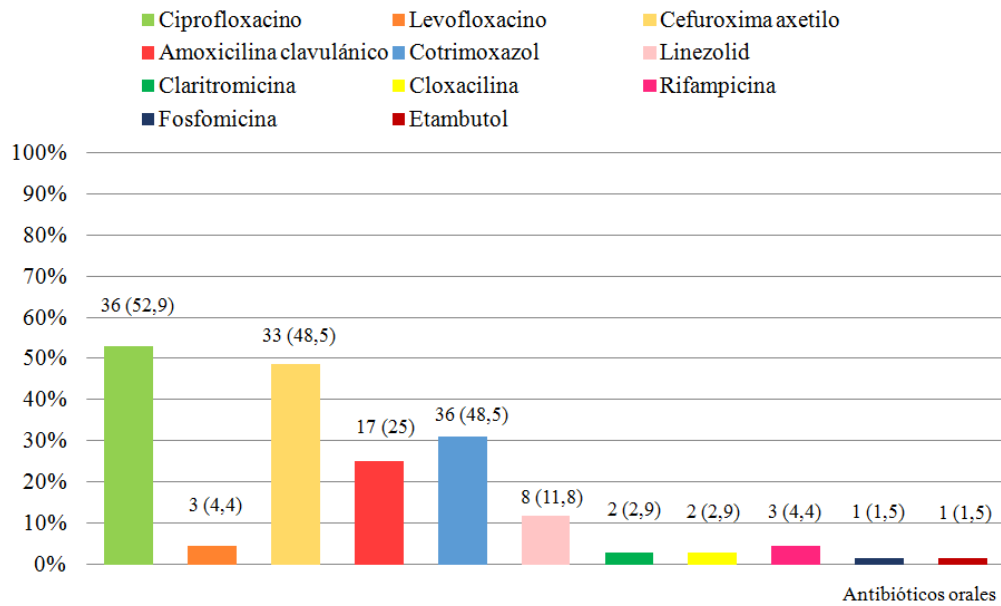
usados con menor frecuencia como se registra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** La antibioterapia inhalada fue aplicada en 56 (82,4%) de los casos, siendo la más usada la colistina en 53 (77,9%) casos, frente a tobramicina con 3(4,4%) casos.

Tabla 10. Tratamientos basales en los 6 meses previos de la población estudiada.

Tratamiento	Valor promedio*
Corticoides inhalados	25 (36,8)
Corticoides orales	1 (1,5)
Antibiótico oral	58 (85,3)
Antibiótico inhalado	56 (82,4)
Antibiótico intravenoso	10 (14,7)
Azitromicina oral (3 veces por semana)	29 (42,6)

*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas).

Figura 10. Distribución de antibioterapia oral utilizada 6 meses previos del inicio del estudio.



*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas).

Figura 11. Distribución de antibioterapia intravenosa utilizada 6 meses previos del inicio del estudio.

*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas).

. En nuestra muestra 38(55,9%) era sexo femenino, con una edad media de 21,5 años, cuya mutación predominante era la Phe508del, presentada en heterocigosis en 28 (41,2%) casos y en homocigosis en 24 (35,3%) casos. La media en el número de exacerbaciones infecciosas en los pacientes FQ en el año previo del inicio del estudio fue de 3 (± 2 DS) con necesidad de utilizar 3,2 ($\pm 2,3$ DS) ciclos de antibióticos al año. En cuanto a las comorbilidades destacar que 46 (67,6%) casos tenían una alteración de la función pancreática exocrina y un 64,7% del páncreas endocrino, incluyéndose en este último aquellos pacientes que padecen DMRFQ e intolerancia a la glucosa. A diferencia del páncreas el hígado estaba afectado en 12 (17,6%) casos. Otras comorbilidades presentes en 18 (26,5%) de los pacientes fueron alteración de la mineralización ósea, pancreatitis agudas, neumotórax, hemoptisis masiva con necesidad de embolización, poliposis nasosinusal, asma bronquial, epilepsia, enfermedad celiaca, intolerancia a la lactosa y vasculitis leucocitoclástica.

Las Pruebas complementarias basales de la población estudiada están resumidas en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Con respecto a las pruebas funcionales, se obtuvo una media de FEV₁ de 59,6% ($\pm 24,7$ DS) y un coeficiente FEV₁/FVC de 62% (± 11 DS). En cuanto a los datos analíticos presentaba una Hemoglobina de 13,8 g/dl ($\pm 1,2$ DS), leucocitos de 8,9 x10⁹/l ($\pm 2,8$ DS), eosinófilos de 0,3 x10⁹/l ($\pm 0,1$ DS) e IgE Total de 455 KU/l (± 938 DS).

Las colonizaciones basales en el año previo de la población estudiada se encuentran resumidas en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** La colonización bacteriana intermitente más frecuente es por *P. aeruginosa* que tiene lugar en 19 (27,9%) casos, seguida de *S. aureus* M Sen 18 (26,5%) casos y *H. influenzae* en 13 (19,1%). A nivel de hongos la colonización

intermitente más frecuente es por *Candida* en 23 (33,8%) casos seguida de *Aspergillus* en 19 (27,9%). La colonización crónica bacteriana que predomina en nuestra cohorte es por *P. aeruginosa* presente en 29 (42,6%) de los casos.

En cuanto a los hongos solo existe colonización crónica en dos casos, 1(1,5%) caso de *Aspergillus* y 1(1,5%) caso por *Levaduras*.

Figura 9. Distribución del seguimiento en la población de estudio.

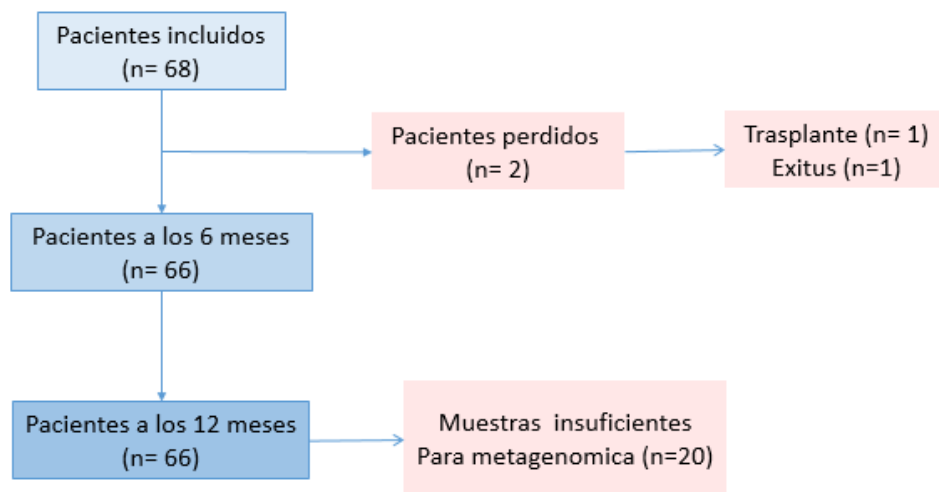


Tabla 7. Características de la población.

Grupo	Característica	Valor promedio*
Datos clínicos	Edad (años)	21,5 (9,7)
	Sexo (hombres)	30 (44,1)
	No fumadores	68 (100)
	No bebedor	68 (100)
	Índice de masa corporal (kg/m ²)	19,2 (3,2)
	Índice BHALLA	14,7 (5,9)
	Exacerbaciones año previo	3 (2)
	Ciclos de antibióticos año previo	3,2 (2,3)
Mutaciones	Phe508del homocigoto	24 (35,3)
	Phe508del heterocigoto	28 (41,2)
	Gly542* homocigoto	0 (0)
	Gly542* heterocigoto	10 (14,7)
	Arg334Trp homocigoto	0 (0)
	Arg334Trp heterocigoto	9 (13,2)
	Otras	7 (10,3)
Comorbilidades	Insuficiencia pancreática exocrina	46 (67,6)
	DMRFQ	10 (14,7)
	Intolerancia a la glucosa	32 (47,1)
	Hepatopatía asociada a la FQ	12 (17,6)
	Aspergilosis broncopulmonar alérgica	3 (4,4)
	Otras comorbilidades	18 (26,5)

*Datos expresados en media (desviación estándar) y en frecuencias absolutas (relativas) según la naturaleza de la variable.

Tabla 8. Pruebas complementarias basales de la población estudiada.

Grupo	Característica	Valor promedio*
Pruebas funcionales	FVC (ml)	2623 (1108)
	FVC (%)	78,6 (22,7)
	FEV ₁ (ml)	1671 (845)
	FEV ₁ (%)	59,6 (24,7)
	FEV ₁ /FVC	62 (11)
Pruebas analíticas	IgE Total (KU/l)	455 (938)
	IgE m ³ <i>Aspergillus fumigatus</i> (KUA/l)	9,6 (22,3)
	IgG <i>Aspergillus fumigatus</i> (mgA/l)	53,7 (38,8)
	Aspergillus IFI	
	Negativo	4 (5,9)
	1/64	14 (20,6)
	1/128	16 (23,5)
	1/256	14 (20,6)
	1/512	7 (10,3)
	1/1024	5 (7,4)
	1/2048	1 (1,5)
	Hemoglobina (g/dl)	13,8 (1,2)
	Leucocitos (x10 ⁹ /l)	8,9 (2,8)
Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	5,3 (2,4)	
Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,3 (0,1)	
Creatinina (mg/dl)	0,6 (0,2)	

*Datos expresados en media (desviación estándar) y en frecuencias absolutas (relativas) según la naturaleza de la variable.

Tabla 9. Colonizaciones basales en el año previo de la población estudiada.

	Microrganismo	Colonización intermitente*	Colonización crónica*
Bacterias	<i>S. aureus MS</i>	18 (26,5)	15 (22,1)
	<i>S. aureus MR</i>	4 (5,9)	7 (10,3)
	<i>P. aeruginosa</i>	19 (27,9)	29 (42,6)
	<i>P. aeruginosa resistente</i>	0 (0)	1 (1,5)
	<i>Serratia sp.</i>	3 (4,4)	2 (2,9)
	<i>S. maltophilia</i>	6 (8,8)	0
	<i>S. pneumoniae</i>	2 (2,9)	0
	<i>H. influenzae</i>	13 (19,1)	0
	<i>B. Cepaceae</i>	9 (13,2)	2 (2,9)
	<i>A. xylosoxidans</i>	6 (8,8)	0
	Otras bacterias	17 (25,3)	1 (1,5)
Hongos	<i>Aspergillus</i>	19 (27,9)	1 (1,5)
	<i>Candida</i>	23 (33,8)	0
	<i>Levaduras</i>	9 (13,2)	1 (1,5)
	Otros hongos	9 (13,3)	0

*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). MR: meticilín-resistente.

MS: meticilín-sensible.

Los tratamientos basales en los 6 meses previos de la población estudiada están resumidos en la Tabla 10. Continuando con el tratamiento realizado por los pacientes de la cohorte, los 6 meses previos al ingreso del estudio, observamos que 25 (36,8%) casos tomaban corticoides inhalados (budesonida y fluticasona) unos 173 (± 33 DS) días, a dosis media de 752 ($\pm 545,5$ DS) μ g. Solo 1 (1,5%)

caso tomó corticoides orales de forma puntual. Respecto al tratamiento antibiótico oral, fue usado en 58 (85,3%) casos de la población como tratamiento de una exacerbación infecciosa, siendo los antibióticos que con mayor frecuencia se usaron ciprofloxacino (52,9%), cefuroxima axetilo (48,5%), cotrimoxazol (30,9%) y amoxicilina clavulánico (25%) como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** La azitromicina por vía oral fue empleada en 29 (42,6%) casos de los pacientes con efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, siendo administrada tres veces por semana.

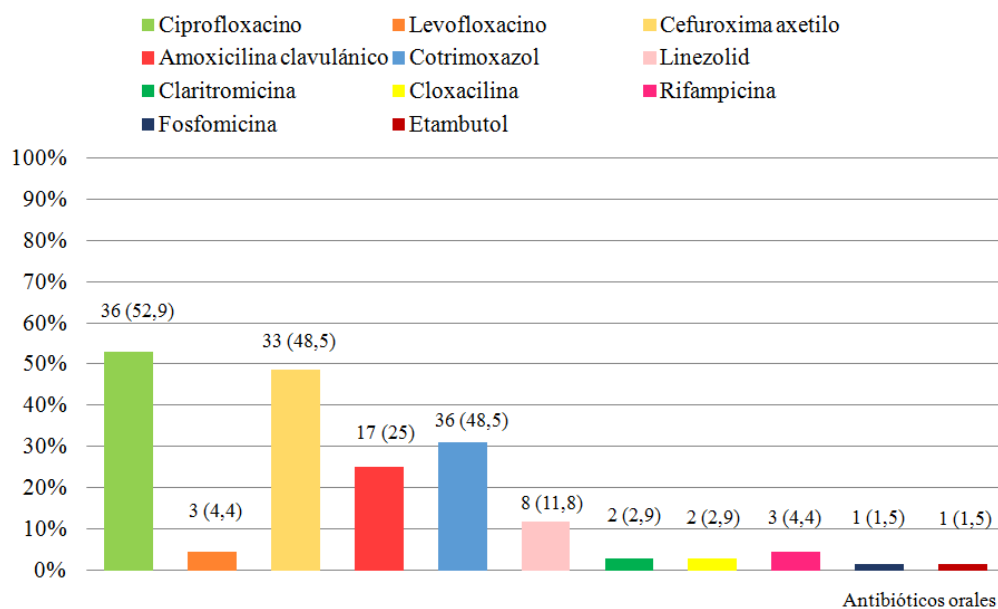
El uso de antibioterapia intravenosa fue inferior a la oral, usada en 10 (14,7%) de los pacientes. Los fármacos más empleados fueron tobramicina (13,2%) y ceftazidima (14,7%). Otros tipos de antibióticos por vía intravenosa fueron usados con menor frecuencia como se registra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** La antibioterapia inhalada fue aplicada en 56 (82,4%) de los casos, siendo la más usada la colistina en 53 (77,9%) casos, frente a tobramicina con 3(4,4%) casos.

Tabla 10. Tratamientos basales en los 6 meses previos de la población estudiada.

Tratamiento	Valor promedio*
Corticoides inhalados	25 (36,8)
Corticoides orales	1 (1,5)
Antibiótico oral	58 (85,3)
Antibiótico inhalado	56 (82,4)
Antibiótico intravenoso	10 (14,7)
Azitromicina oral (3 veces por semana)	29 (42,6)

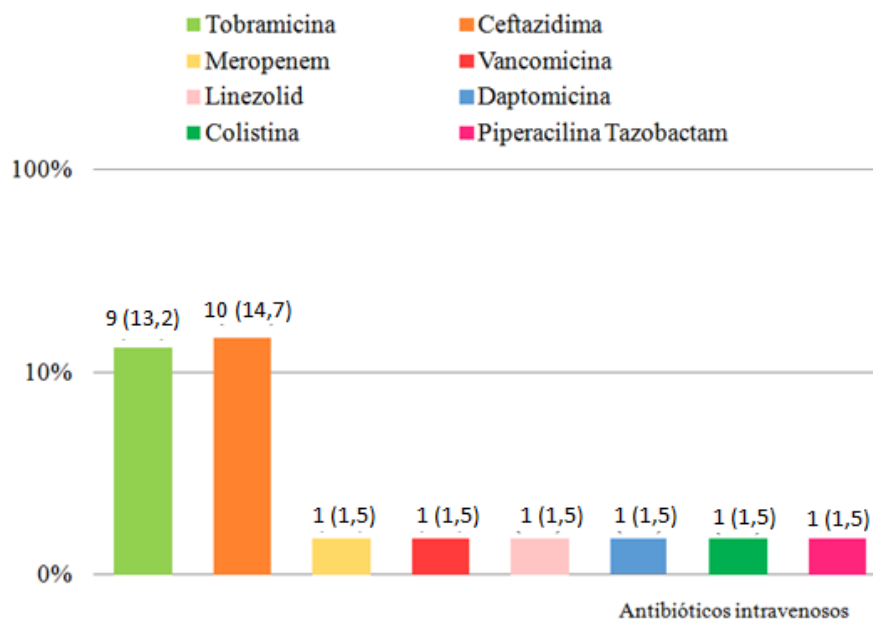
*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas).

Figura 10. Distribución de antibioterapia oral utilizada 6 meses previos del inicio del estudio.



*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas).

Figura 11. Distribución de antibioterapia intravenosa utilizada 6 meses previos del inicio del estudio.



*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas).

Objetivo 1. Identificar por cultivo convencional y por metagenómica la población fúngica.

Si analizamos la capacidad de identificar las especies fúngicas, del cultivo convencional de esputo y la técnica de metagenómica a lo largo del seguimiento, observamos que la detección de hongos en la muestra de esputo de los pacientes de la cohorte fue mayor con la técnica molecular que con el cultivo, tal como se muestra en la

Tabla 11.

Tabla 11. Diferencias en la detección de hongos entre las técnicas convencionales y las moleculares

Técnicas de detección		Basal*	1º Semestre*	2º Semestre*
Cultivo de esputo	Positivo	15 (22,1)	14 (21,2)	19 (28,8)
	Negativo	53 (77,9)	52 (78,8)	47 (71,2)
	No realizado	0 (0)	2 (3)	2 (3)
Técnica metagenómica	Positivo	46 (67,6)	40 (60,6)	30 (65,2)
	Negativo	22 (32,4)	26 (39,4)	16 (34,8)
	No realizado	0 (0)	2 (3)	22 (47,)

*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas)

Las diferencias de detección de hongos entre ambas técnicas en la visita basal están reflejadas en la Figura 12. Con el cultivo convencional observamos que el género que con mayor frecuencia fue aislado en el primer periodo de tiempo, fue el género *Aspergillus* en 7 (10,3%) casos, siendo la especie aislada en todos los casos el *A. fumigatus*. Siguiendo a este encontramos a las *Levaduras spp* (no identificado el género), presentes en 5(7,4%) de los pacientes. El tercer género encontrado fue *Candida* con 4 (5,9%) casos, siendo la especie *C. albicans* la predominante en todos los casos. Otras especies encontradas, aunque en menor proporción fueron *Cryptococcus* y otros hongos filamentosos. Los hallazgos encontrados en el cultivo convencional difieren de los hallazgos detectados por técnicas moleculares. A diferencia del cultivo convencional, *Candida* fue el género más frecuente en 26 (38,2%) casos, seguido por *Aspergillus* en 7 (10,3%) casos, *Cladosporium* 4 (5,9%) casos y *Cryptococcus* 2 (2,9%) casos. Con respecto a las especies de *Candida* se identificaron tres especies *C. albicans*, en mayor proporción en 16 (23,5) casos, *C. parapsilosis* en 9 (13,2%) casos y *C. glabrata* en 1 (1,5%) caso. Otras especies encontradas, aunque en menor proporción, fueron *Dioscorea* y *Alternaria*, entre otros, aunque en menor proporción. Otro hongo para tener en cuenta fue *Pneumocystis* hallado en 25(36,8%) de los pacientes.

Las diferencias de detección de hongos entre ambas técnicas a los 6 meses están reflejadas en la Figura 13. Al igual que el tiempo basal, el hongo que con mayor frecuencia fueron aislados por cultivo convencional es *Aspergillus* en 6 (9,1%) y *Levaduras sp* en 6 (9,1%) casos, en igual número de pacientes. La especie de *Aspergillus* aislada fue *A. fumigatus* en sólo 2 (3%) pacientes. Al igual que el tiempo anterior de seguimiento se identificaron otros hongos filamentosos. Y un nuevo género de hongo que previamente no había aparecido el

Scedosporium en 1 (1,5%) caso. En cuanto a la detección mediante metagenómica, observamos que *Candida* es el hallado con más frecuencia, en segundo lugar, *Cladosporium* 7 (10,6%) casos y el tercero *Aspergillus* 3 (4,5%) casos; sin tener encuenta *Pneumocystis* presente en 22 (33,3%) de los casos. Las especies de *Candida* que se han distinguido han sido *C. albicans* 15 (22,7%), *C. tropicalis* 7 (10,6%), *C. parapsilosis* 1 (1,5%), *C. glabrata* 1 (1,5%) y *C. gali* 1 (1,5%). Otros hongos que se han encontrado son *Levaduras spp*, *Scedosporium*, *Dioscorea* y *Alternaria*.

Las diferencias de detección de hongos entre ambas técnicas a los 12 meses están reflejadas en la Figura 14. La distribución de los hongos observados por cultivo de esputo es diferente en este tiempo de seguimiento que, en los anteriores, ya que podemos observar que el más frecuente son las *Levaduras spp* 8 (12,1%) casos, seguidas por *Aspergillus* 6 (9,1%) y *Candida* 6 (9,1%). En este periodo las especies identificadas no solo fue *A. fumigatus* en 3 (4,5%) también se encontró al *A. niger* 1 (1,5%). En cuanto al género *Candida*, las especies fueron *C. albicans* 4 (6,1%) y *C. parapsilosis* 1 (1,5%). También se visualizaron *Scedosporium* y otros hongos filamentosos. La presencia de *Pneumocystis* ha permanecido estable durante el periodo de seguimiento, estando presente en la revisión anual en 21 (37,5%) de los pacientes. Con respecto al resto de géneros detectado por la técnica molecular *Candida* continúa siendo la más frecuente 17 (37%) con la distinción de las siguientes especies *C. albicans* 11 (23,9%), *C. parapsilosis* 5 (10,9%) y *C. gali* 1 (2,2%). *Aspergillus* 2 (4,49%) y *Cladosporium* 2 (4,4%) le siguen en orden de frecuencia.

La evolución en el tiempo de los cultivos convencionales está reflejada en la
*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas) n= 66 para cultivo convencional, n=46 para metagenómica, n= 56 metagenómica *Pneumocystis*.

Técnica molecular

Cultivo convencional

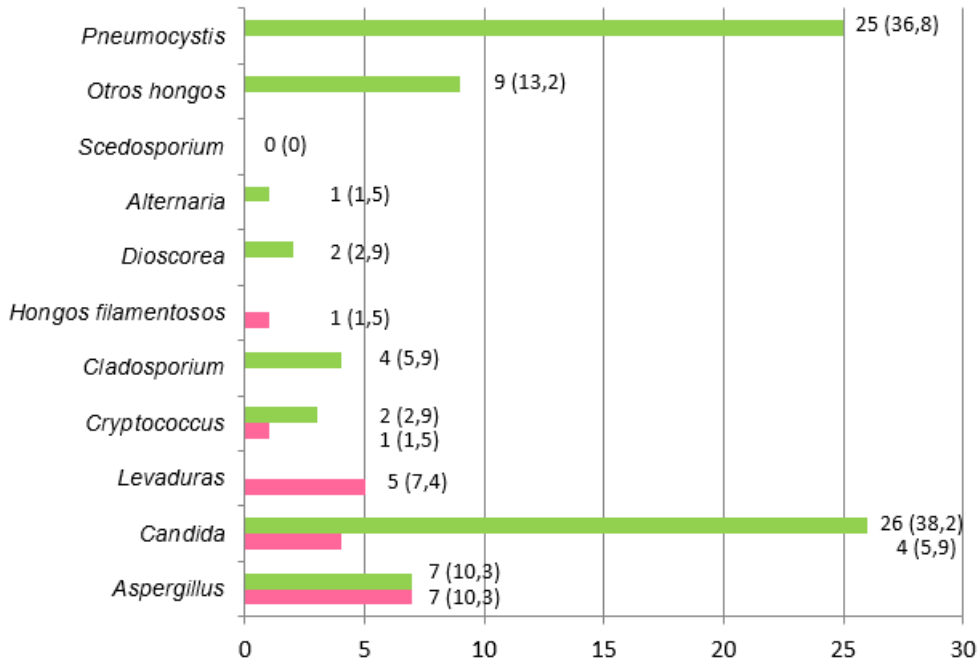
Figura 15. Debido a la menor rentabilidad de las técnicas convencionales, la mayoría tenían un resultado negativo que se mantenía en el tiempo. Al contrario, en la evolución en el tiempo de las técnicas de metagenómica (Figura 16) el porcentaje de positivos era superior y se mantenía durante el tiempo.

En relación con géneros concretos de hongos, la evolución del Género *Candida* está reflejada en la Figura 17. La distribución de pacientes parece dar una población que está persistentemente colonizado por *Candida* en un total de 6 (8,8%) casos de nuestra cohorte. Por otro lado, en 12 (17,6%) casos se daba el fenómeno inverso, en ninguna de las determinaciones se detectó *Candida* en el esputo.

La evolución de *Aspergillus* se muestra en la Figura 18. La detección inicial fue menor que en el género *Candida* con tan solo 7 (10,2%) casos iniciales. A evolución en el tiempo fue menos estable.

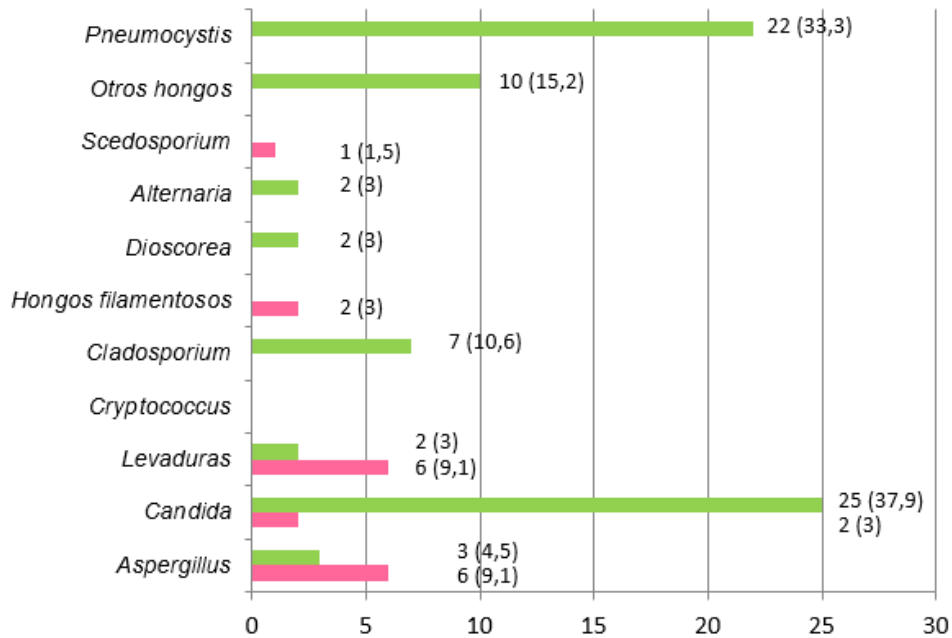
La evolución de *Pneumocystis* se muestra en la Figura 19. Su patrón de aparición era similar al género *Candida*. En 4 (5,8%) casos había una presencia persistente de *Pneumocystis*, mientras que en 19 (27,9%) casos era persistentemente negativa.

Figura 12. Detección hongos por ambas técnicas en la visita 1.



*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas).

Figura 13. Detección hongos por ambas técnicas en la visita 2.

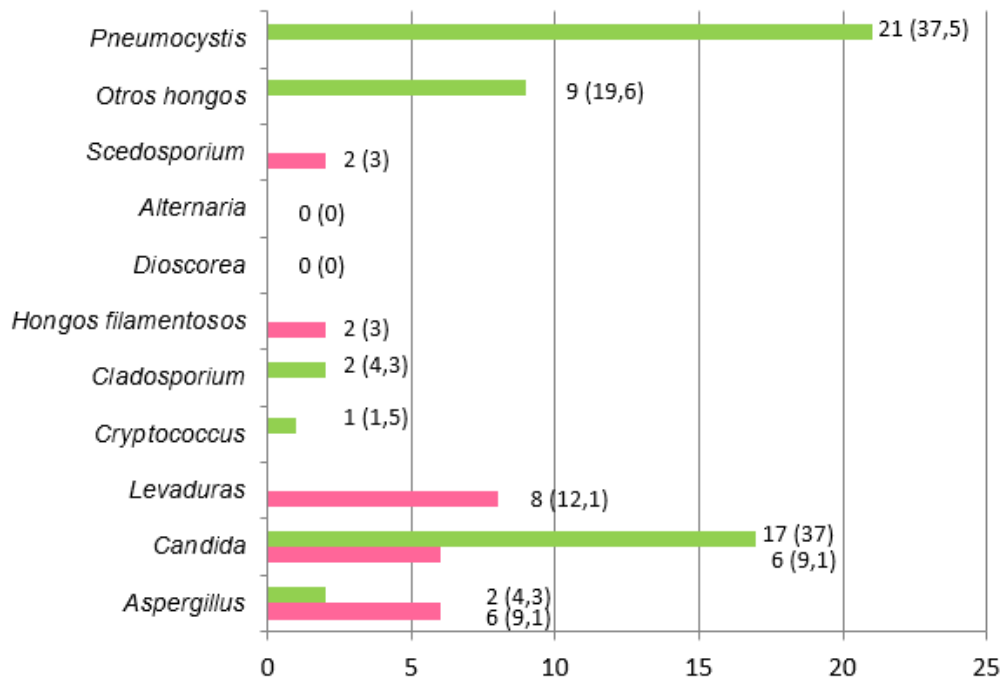


*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas), n= 66.

■ técnica molecular

■ cultivo convencional

Figura 14. Detección hongos por ambas técnicas en la visita 3.



*Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas) n= 66 para cultivo convencional, n=46 para metagenómica, n= 56 metagenómica *Pneumocystis*.

■ Técnica molecular ■ Cultivo convencional

Figura 15. Progresión en el tiempo de los cultivos convencionales.

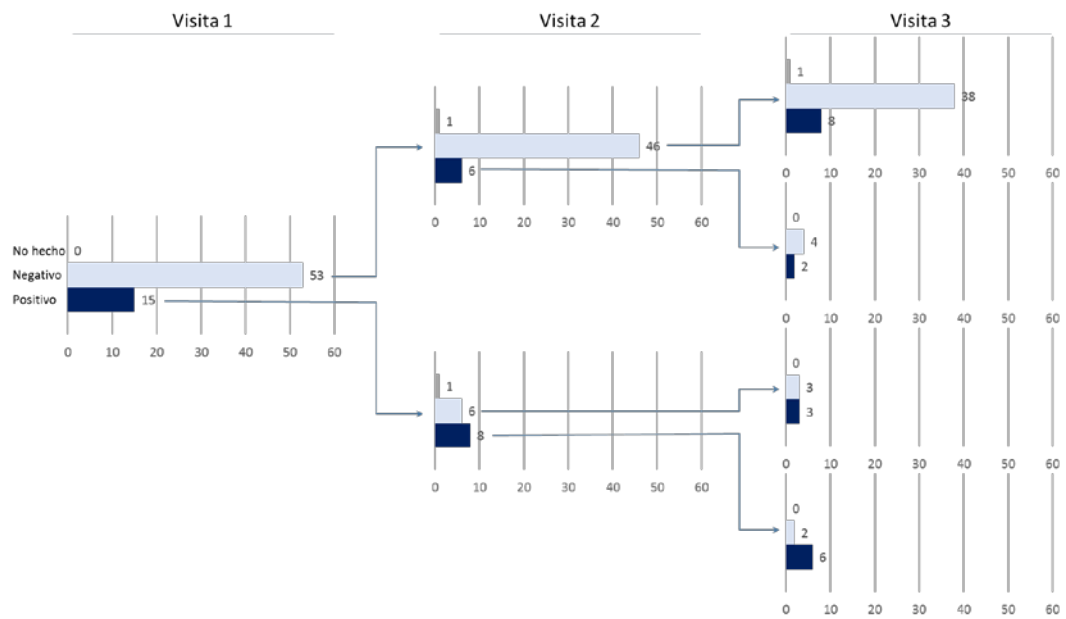


Figura 16. Progresión en el tiempo de los cultivos por metagenómica.

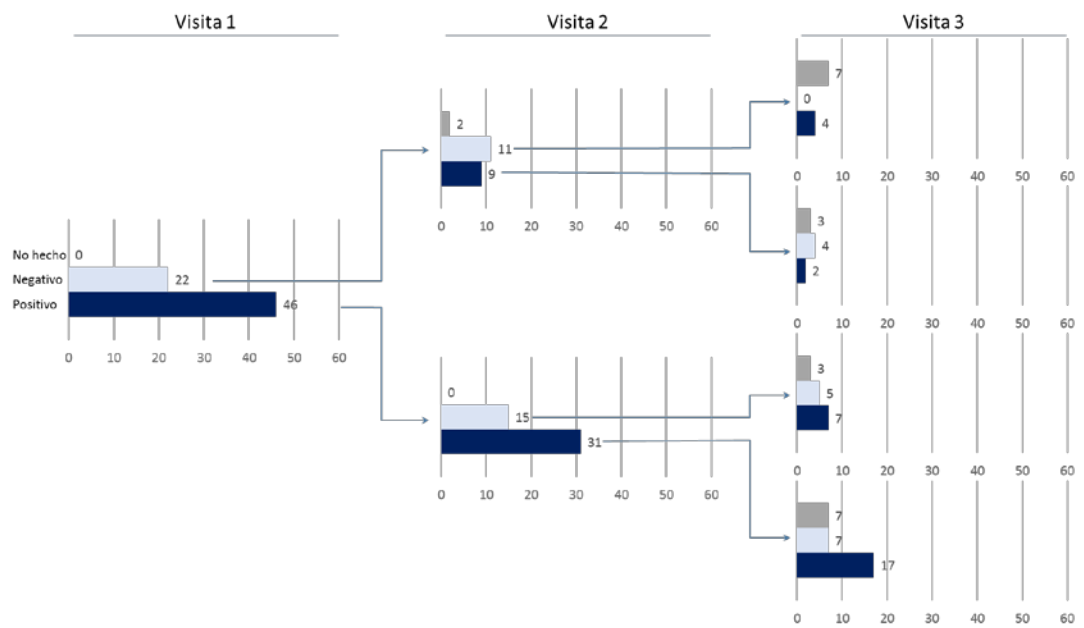


Figura 17. Progresión en el tiempo de los cultivos por metagenómica del género *Candida*.

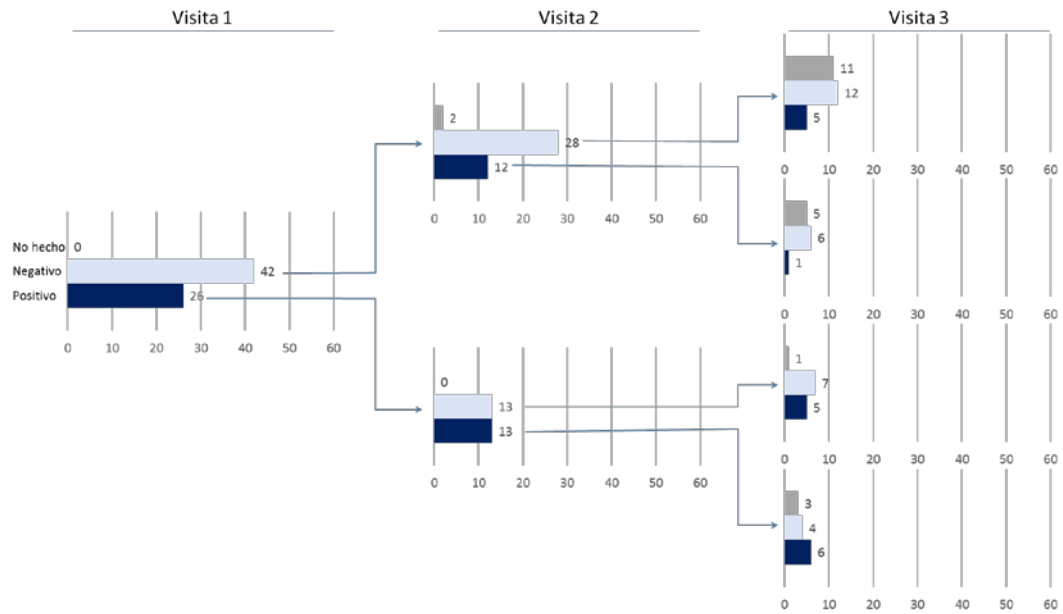


Figura 18. Progresión en el tiempo de los cultivos por metagenómica del género *Aspergillus*.

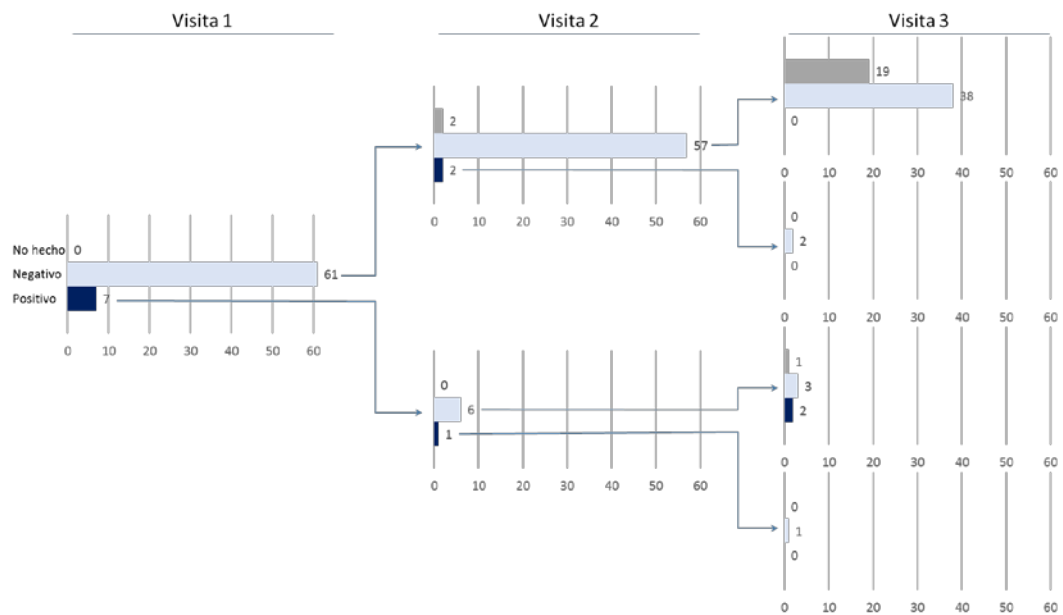
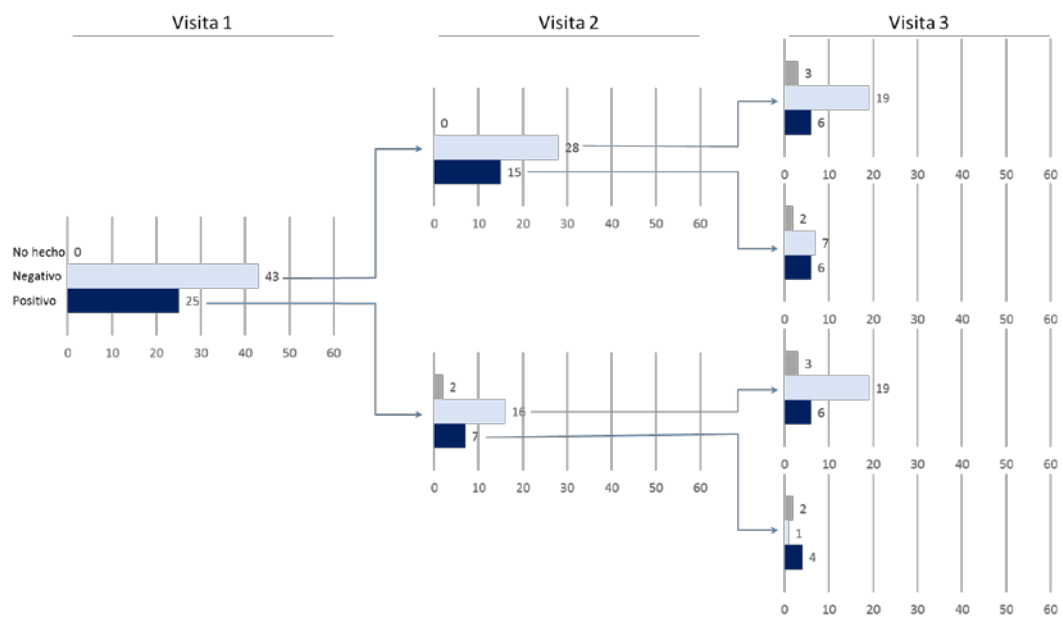


Figura 19. Progresión en el tiempo de los cultivos por metagenómica del género *Pneumocystis*.



Objetivo 2. Analizar la concordancia entre la identificación convencional y la biología molecular.

El grado de concordancia entre ambas técnicas, convencional y metagenómica, en la visita 1 se muestra en la *Tabla 12*. El índice kappa fue no significativo, indicando una falta del grado de acuerdo. Tomando como estándar de referencia a los resultados de la metagenómica, el perfil diagnóstico de los cultivos convencionales en la visita 1 se muestra en la *Tabla 13*. En la *Tabla 13* se observa que existe una sensibilidad del 23,91% con IC 95%:13,77-34,05% y una especificidad del 81,82% con IC 95%: 72,65-90,99%. Para una prevalencia del 67,65%, el VPP es 73,33% y el VPN 33,96%.

El grado de concordancia entre ambas técnicas, convencional y metagenómica, en la visita 2 se muestra en la *Tabla 14*. El índice kappa fue no significativo, indicando una falta del grado de acuerdo. Tomando como estándar de referencia a los resultados de la metagenómica, el perfil diagnóstico de los cultivos convencionales en la visita 2 se muestra en la *Tabla 15*. En dicha *Tabla* se muestra una sensibilidad del 20% con IC 95%:10,35-29,65% y una especificidad del 76,92% con IC 95%: 66,76-87,09%. Para una prevalencia del 60,61%, el VPP es 57,14% y el VPN 38,46%.

El grado de concordancia entre ambas técnicas, convencional y metagenómica, en la visita 3 se muestra en la *Tabla 16*. El índice kappa fue no significativo, indicando una falta del grado de acuerdo. Tomando como estándar de referencia a los resultados de la metagenómica, el perfil diagnóstico de los cultivos convencionales en la visita 3 se muestra en la *Tabla 17*. En la *Tabla* se puede observar una sensibilidad del 36,67% con IC 95%: 22,74-50,59% y una especificidad del 87,50% con IC 95%:77,94-97,06%. Para una prevalencia del 65,22%, el VPP es 84,62% y el VPN 42,42%.

Tabla 12. Concordancia entre técnicas convencionales y metagenómica en visita 1.

		Metagenómica		Total
		Positivo	Negativo	
Convencional	Positivo	11 (16,2)	4 (5,9)	15 (22,1)
	Negativo	35 (51,5)	18 (26,5)	53 (77,9)
Total		46 (67,6)	22 (32,4)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa.

Tabla 13. Perfil diagnóstico del cultivo convencional en la visita 1.

	Valor	IC 95%		IC 99%	
Prevalencia	67,65%	56,53%	78,77%	53,01%	82,28%
Sensibilidad	23,91%	13,77%	34,05%	10,57%	37,26%
Especificidad	81,82%	72,65%	90,99%	69,75%	93,89%
Proporción FP	18,18%	9,01%	27,35%	6,11%	30,25%
Proporción FN	76,09%	65,95%	86,23%	62,74%	89,43%
VPP	73,33%	62,82%	83,84%	59,50%	87,17%
VPN	33,96%	22,71%	45,22%	19,15%	48,78%

FP: falsos positivos. FN: falsos negativos. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. IC: intervalo de confianza.

Tabla 14. Concordancia entre técnicas convencionales y metagenómica en visita 2.

		Metagenómica		Total
		Positivo	Negativo	
Convencional	Positivo	8 (11,8)	6 (8,8)	14 (21,2)
	Negativo	32 (41,7)	20 (29,4)	52 (78,8)
Total		40 (60,6)	26 (39,4)	66 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa.

Tabla 15. Perfil diagnóstico del cultivo convencional en la visita 2.

	Valor	IC 95%		IC 99%	
Prevalencia	60,61%	48,82%	72,39%	45,09%	76,12%
Sensibilidad	20,00%	10,35%	29,65%	7,30%	32,70%
Especificidad	76,92%	66,76%	87,09%	63,54%	90,30%
Proporción FP	23,08%	12,91%	33,24%	9,70%	36,46%
Proporción FN	80,00%	70,35%	89,65%	67,30%	92,70%
VPP	57,14%	45,20%	69,08%	41,43%	72,86%
VPN	38,46%	26,72%	50,20%	23,01%	53,91%

FP: falsos positivos. FN: falsos negativos. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. IC: intervalo de confianza.

Tabla 16. Concordancia entre técnicas convencionales y metagenómica en visita 3.

		Metagenómica		Total
		Positivo	Negativo	
Convencional	Positivo	11 (23,9)	2 (4,3)	13 (28,3)
	Negativo	19 (41,3)	14 (30,4)	33 (71,7)
Total		30 (65,2)	16 (34,8)	46 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa.

Tabla 17. Perfil diagnóstico del cultivo convencional en la visita 3.

	Valor	IC 95%		IC 99%	
Prevalencia	65,22%	51,45%	78,98%	47,10%	83,34%
Sensibilidad	36,67%	22,74%	50,59%	18,34%	55,00%
Especificidad	87,50%	77,94%	97,06%	74,92%	100,08%
Proporción FP	12,50%	2,94%	22,06%	-0,08%	25,08%
Proporción FN	63,33%	49,41%	77,26%	45,00%	81,66%
VPP	84,62%	74,19%	95,04%	70,89%	98,34%
VPN	42,42%	28,14%	56,71%	23,62%	61,22%

FP: falsos positivos. FN: falsos negativos. VPP: valor predictivo positivo. VPN: valor predictivo negativo. IC: intervalo de confianza.

Objetivo 3. Relacionar la colonización fúngica con otros microorganismos presentes, así como la presencia de coinfecciones.

Para valorar si existe una asociación entre la colonización crónica o intermitente previa sobre los aislamientos de hongos por ambas técnicas, se presentan las siguientes tablas de contingencia evaluando esta relación.

Pseudomonas

En la .

Tabla 18 se muestra la relación entre colonización crónica por *Pseudomonas* y aislamientos de hongos por cultivo convencional en visita 1 sin que se haya podido confirmar dicha relación, mientras que en la Tabla 19 se muestra la relación entre colonización crónica por *Pseudomonas* y aislamientos por metagenómica en visita 1, igualmente la asociación no fue estadísticamente significativa.

La relación entre colonización intermitente por *Pseudomonas* y aislamiento de hongos se ha explorado en la Tabla 20 para el cultivo convencional y en la Tabla 21 para las técnicas de metagenómica. En ambos casos, la relación no fue significativa.

La asociación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y la presencia o ausencia de cambios entre la visita 1 y 2, reflejada en la Tabla 22, entre la visita 2 y 3, en la Tabla 23 y entre las visitas 1 y 3, en la Tabla 24, fue analizada sin encontrar asociaciones significativas entre estas variables.

Se analizaron la relación entre colonización crónica por *Pseudomonas* y aislamientos de hongos por cultivo convencional y metagenómica en la visita 2 así como la relación entre colonización intermitente por *Pseudomonas*

aislamientos de hongos por cultivo convencional y metagenómica en la visita 2 sin encontrar hallazgos significativos.

En la visita 3, tampoco se encontraron asociaciones significativas entre la colonización crónica por *Pseudomonas* y aislamientos de hongos por cultivo convencional, como se muestra en la Tabla 25, o por metagenómica fúngica, como se observa en la Tabla 26. Al igual que no se encontraron asociaciones significativas entre colonización intermitente por *Pseudomonas* y aislamientos de hongos por cultivo convencional, expresado en la Tabla 27 o mediante técnicas metagenómicas, como se muestra en la Tabla 28.

A continuación, se presentan las tablas de contingencias que analizan la influencia de la colonización crónica o intermitente previa por *Pseudomonas* sobre los aislamientos de hongos más frecuentemente detectados en nuestra cohorte mediante técnicas de metagenómica (*Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis*).

La Tabla 29 muestra la relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamientos de *Candida* detectado mediante técnica metagenómica en la visita 1, la Tabla 30 muestra la relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamientos de *Aspergillus* detectado mediante técnica metagenómica en la visita 1 y la Tabla 31 muestra la relación existente con *Pneumocystis* en la visita 1. En ninguno de los casos se encontraron asociaciones significativas.

La relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamientos de *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis* detectados mediante técnica metagenómica en la visita 1, se analizan en la Tabla 32, Tabla 33 y Tabla 34

respectivamente, sin obtener una relación significativa para ninguna de estas variables.

La relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamientos de *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis* detectados mediante técnica metagenómica en la visita 2 y la relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamientos de *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis* detectados mediante técnica metagenómica en la visita 2, no fueron significativas.

En la Tabla 35 podemos observar la relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamientos de *Candida* detectado mediante técnica metagenómica en la visita 3, la Tabla 36 muestra la relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamientos de *Aspergillus* detectado mediante técnica metagenómica en la visita 3 y la Tabla 37 muestra la relación existente con *Pneumocystis* en visita 3. En ninguno de los casos se obtuvo una relación significativa.

La relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamientos de *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis* detectados mediante técnica metagenómica en la visita 3, se analizan en la Tabla 38, Tabla 39 y Tabla 40 respectivamente. No se obtuvieron relaciones significativas en ninguna de las variables.

Staphylococcus

La Tabla 25 Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 3

		Colonización crónica		Total
		Pseudomonas		
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 3	Positivo	6 (8,8)	13 (19,1)	19 (27,9)
	Negativo	22 (28,6)	25 (32,8)	47 (61,1)
	No realizado	2 (2,9)	0(0)	2 (2,9)
Total		30 (44,1)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.257

Tabla 26 Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 3

		Colonización crónica		Total
		Pseudomonas		
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 3	Positivo	12 (17,6)	18 (26,5)	30 (44,1)
	Negativo	9 (13,2)	7 (10,3)	16 (23,5)
	No realizado	9 (13,3)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		30 (44,1)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.292

Tabla 27 Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 3	Positivo	7 (10,3)	12 (17,6)	19 (27,9)
	Negativo	12 (17,6)	35 (51,5)	47 (69,1)
	No realizado	0 (0)	2 (2,9)	2 (2,9)
Total		19(27,9)	49 (72,1)	68(100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.358

Tabla 28 Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 3	Positivo	11 (16,2)	19 (27,9)	30 (44,1)
	Negativo	3 (4,4)	13 (19,1)	16 (23,5)
	No realizado	5 (7,4)	17 (25)	22 (32,4)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.20

Tabla 29 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 1.

		Colonización Crónica		Total
		<i>Pseudomonas</i>		
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 1	Positivo	12 (17,6)	14 (20,6)	26 (38,2)
	Negativo	18(26,5)	24(35,3)	42 (61,8)
Total		30 (44,1)	38(55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado: 0.790)

Tabla 30 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 1.

		Colonización Crónica		Total
		<i>Pseudomonas</i>		
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 1	Positivo	4 (5,9)	3 (4,4)	7 (10,3)
	Negativo	26(38,2)	35(51,5)	61 (89,7)
Total		30 (44,1)	38(55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.464

Tabla 31 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 1.

		Colonización Crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 1	Positivo	11(17,1)	14(21,7)	25 (38,8)
	Negativo	19 (27,9)	24 (35,3)	43 (63,2)
Total		30(44,1)	38(55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.988

Tabla 32 Relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 1	Positivo	8 (11,8)	18 (26,4)	26 (38,2)
	Negativo	11 (16,2)	31 (45,6)	42 (61,8)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.683

Tabla 33 Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente		Total
		<i>Pseudomonas</i>		
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 1	Positivo	0 (0)	7 (10,3)	7 (10,3)
	Negativo	19 (27,9)	42 (61,8)	61 (89,7)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.082

Tabla 34 Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente		Total
		<i>Pseudomonas</i>		
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 1	Positivo	7 (10,3)	18 (26,5)	25 (36,8)
	Negativo	12 (17,6)	31 (45,6)	43 (63,2)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.993

Tabla 35 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 3	Positivo	8 (11,8)	9 (13,2)	17 (25)
	Negativo	13 (19,1)	16 (23,5)	29 (42,6)
	No realizado	9 (13,3)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		30 (44,2)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.924

Tabla 36 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 3	Positivo	1 (1,45)	1 (1,45)	2 (2,9)
	Negativo	20 (29,4)	24 (35,3)	44 (64,7)
	No realizado	9 (13,3)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		30 (44,2)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.927

Tabla 37 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 3	Positivo	11 (16,2)	10 (14,7)	21 (30,9)
	Negativo	14 (20,6)	23 (33,8)	37 (54,4)
	No realizado	5 (7,35)	5 (7,35)	10 (14,7)
Total		30 (44,2)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.518

Tabla 38 Relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 3	Positivo	7 (10,3)	10 (14,7)	17 (25)
	Negativo	7 (10,3)	22 (32,3)	29 (42,6)
	No realizado	5 (7,4)	17 (19,1)	22 (32,4)
Total		19 (27,9)	49 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.371

Tabla 39 Relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 3	Positivo	0(0)	2(2,9)	2(2,9)
	Negativo	14(20,6)	30(44,1)	44(64,7)
	No realizado	5 (7,4)	17 (25)	22(32,4)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.496

Tabla 40 Relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 3	Positivo	5 (7,35)	16 (23,5)	21 (30,9)
	Negativo	12 (17,6)	25 (36,8)	37 (54,4)
	No realizado	2 (2,9)	8 (11,8)	10 (14,7)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.650

muestra la relación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y aislamientos por cultivo convencional en la visita 1 donde se observa una

relación significativa (valor p por Chi-cuadrado: 0,016), mientras que la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestra la relación entre colonización crónica previa y aislamientos por metagenómica en la visita 1, no obteniéndose una asociación significativa en este caso.

La relación entre colonización intermitente por *Staphylococcus* y aislamiento de hongos se ha analizado en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** para el cultivo convencional y en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** para las técnicas de metagenómica. En ambos casos, la relación no fue significativa.

La asociación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y la presencia o ausencia de cambios entre la visita 1 y 2, reflejada en la Tabla 45, entre la visita 2 y 3, en la Tabla 46 y entre las visitas 1 y 3, en la Tabla 47, fue analizada sin encontrar asociaciones significativas entre estas variables.

Al analizar la relación entre colonización crónica por *Staphylococcus* y aislamientos por cultivo convencional en la visita 2 mostrada en la Tabla 48, observamos que existe una relación significativa (valor p significativo por Chi-cuadrado: 0.019) que no se reproduce utilizando la técnica metagenómica. La colonización intermitente por *Staphylococcus* no mostró asociación significativa con los aislamientos por cultivo convencional y metagenómica en la visita 2.

En la visita 3, no se encontraron asociaciones significativas entre colonización crónica por *Staphylococcus* y aislamientos de hongos por cultivo convencional, Tabla 49, ni mediante aislamientos por metagenómica fúngica, tal como se muestra en la Tabla 50.

El análisis entre colonización intermitente por *Staphylococcus* y aislamiento de hongos mostrado en la Tabla 51 para el cultivo convencional y en la Tabla 52 para las técnicas de metagenómica, tampoco encontró asociaciones significativas.

En las sucesivas tablas de contingencias se analizan la relación de la colonización crónica o intermitente previa por *Staphylococcus* sobre los aislamientos de hongos que han sido detectado con mayor frecuencia en la cohorte mediante técnicas metagenómica (*Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis*).

En la visita 1, no se encontraron asociaciones significativas entre la colonización crónica previa por *Staphylococcus* con los aislamientos mediante técnica metagenómica de *Candida*, mostrado en la Tabla 53; *Aspergillus* mostrado en la Tabla 54 y *Pneumocystis* mostrado en la Tabla 55.

La relación entre colonización intermitente previa por *Staphylococcus* y aislamientos de *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* detectados mediante técnica metagenómica en la visita 1, se analizan en la Tabla 56, Tabla 57 y Tabla 58 respectivamente, sin encontrar asociaciones significativas.

En la Tabla 59, observamos una asociación significativa entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* con el aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en la visita 2, (valor p por Chi-cuadrado:0.025). La relación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y el aislamiento de *Candida* o *Pneumocystis* por metagenómica en la visita 2 no mostraron asociación significativa.

En la visita 3, no se encontraron asociaciones significativas entre la colonización crónica previa por *Staphylococcus* y aislamientos mediante técnicas metagenómicas de *Candida* como se observa en la Tabla 60, *Aspergillus* en la Tabla 61 o *Pneumocystis* en la Tabla 62; ni entre la colonización intermitente por *Staphylococcus* y el aislamiento de estos hongos por la misma técnica (Tabla 63, 64 y 65 respectivamente).

Serratia

En la Tabla 66 se muestra la relación entre colonización crónica previa por *Serratia* y el aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en la visita 2, (valor p significativo por Chi-cuadrado:0.006). Sin embargo, no se reprodujo dicha relación entre colonización crónica previa por *Serratia* y el aislamiento de *Candida* o *Pneumocystis* por metagenómica ni entre colonización intermitente previa por *Serratia* y aislamiento de *Candida*, *Aspergillus* o *Pneumocystis* por metagenómica en la visita 2.

La relación entre colonización crónica previa por *Serratia* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en la visita 3, que se ilustra en la Tabla 67 fue significativa (valor p por Chi-cuadrado:0.045). No se obtuvieron asociaciones significativas entre la crónica previa por *Serratia* y el aislamiento de *Aspergillus* y *Pneumocystis* por metagenómica en visita 3, ni relación entre la intermitente previa por *Serratia* y aislamiento de *Candida*, *Aspergillus* o *Pneumocystis* por metagenómica en dicha visita.

Tabla 18. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 1.

		Colonización crónica Pseudomonas		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 1	Positivo	7 (10,3)	8 (11,8)	15 (22,1)
	Negativo	23 (33,8)	30 (44,1)	53 (77,9)
Total		30 (44,1)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.822.

Tabla 19. Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 1.

		Colonización crónica Pseudomonas		Total
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 1	Positivo	22 (32,4)	24 (35,3)	46 (67,6)
	Negativo	8 (11,8)	14 (20,6)	22 (32,4)
Total		30 (44,1)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.373.

Tabla 20. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 1.

		Colonización intermitente Pseudomonas		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 1	Positivo	7 (10,3)	8 (11,8)	15 (22,1)
	Negativo	12 (17,6)	41 (60,3)	53 (77,9)

Total	19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)
-------	-----------	-----------	----------

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.067.

Tabla 21. Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 1	Positivo	11 (16,2)	35 (51,1)	46 (67,6)
	Negativo	8 (11,8)	14 (20,6)	22 (32,4)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.284.

Tabla 22. Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 1 y 2 y la colonización crónica previa por Pseudomonas.

	Colonización crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
	Positivo	Negativo	
	Negativo persistente	3 (10,0)	
Adquisición cepa	3 (10,0)	6 (15,8)	9 (13,2)
Pérdida cepa	7 (23,3)	8 (21,1)	15 (22,1)

Positivo persistente	15 (50,0)	16 (42,1)	31 (45,6)
No realizado	2 (6,7)	0 (0)	2 (2,9)
Total	30 (100)	38 (100)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la columna. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.593.

Tabla 23. Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 2 y 3 y la colonización crónica previa por Pseudomonas.

	Colonización crónica		Total
	Pseudomonas		
	Positivo	Negativo	
Negativo persistente	3 (10,0)	2 (5,3)	5 (7,4)
Adquisición cepa	3 (10,0)	8 (21,1)	11 (16,2)
Pérdida cepa	6 (20,0)	5 (13,2)	11 (16,2)
Positivo persistente	9 (30,0)	10 (26,3)	19 (27,9)
No realizado	9 (30,0)	13 (34,2)	22 (32,4)
Total	30 (100)	38 (100)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la columna. Valor p no significativo por Chi-cuadrado: 0.515

Tabla 24. Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 1 y 3 y la colonización crónica previa por Pseudomonas.

	Colonización crónica		Total
	Pseudomonas		
	Positivo	Negativo	
Negativo persistente	2 (6,7)	2 (5,3)	4 (5,9)
Adquisición cepa	2 (6,7)	4 (10,5)	6 (8,8)

Pérdida cepa	12 (40,0)	10 (26,3)	22 (32,4)
Positivo persistente	10 (33,3)	14 (36,8)	24 (35,3)
No realizado	4 (13,3)	8 (21,1)	12 (17,6)
Total	30 (100)	38 (100)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la columna. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.744

Tabla 25 Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 3

		Colonización crónica Pseudomonas		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 3	Positivo	6 (8,8)	13 (19,1)	19 (27,9)
	Negativo	22 (28,6)	25 (32,8)	47 (61,1)
	No realizado	2 (2,9)	0(0)	2 (2,9)
Total		30 (44,1)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.257

Tabla 26 Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 3

		Colonización crónica Pseudomonas		Total
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 3	Positivo	12 (17,6)	18 (26,5)	30 (44,1)
	Negativo	9 (13,2)	7 (10,3)	16 (23,5)

	No realizado	9 (13,3)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		30 (44,1)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.292

Tabla 27 Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por cultivo convencional en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 3	Positivo	7 (10,3)	12 (17,6)	19 (27,9)
	Negativo	12 (17,6)	35 (51,5)	47 (69,1)
	No realizado	0 (0)	2 (2,9)	2 (2,9)
Total		19(27,9)	49 (72,1)	68(100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.358

Tabla 28 Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamientos por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 3	Positivo	11 (16,2)	19 (27,9)	30 (44,1)
	Negativo	3 (4,4)	13 (19,1)	16 (23,5)
	No realizado	5 (7,4)	17 (25)	22 (32,4)

Total	19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)
-------	-----------	-----------	----------

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.20

Tabla 29 Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamiento de Candida por metagenómica en visita 1.

		Colonización Crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 1	Positivo	12 (17,6)	14 (20,6)	26 (38,2)
	Negativo	18(26,5)	24(35,3)	42 (61,8)
Total		30 (44,1)	38(55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado: 0.790)

Tabla 30 Relación entre colonización crónica previa por Pseudomonas y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 1.

		Colonización Crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 1	Positivo	4 (5,9)	3 (4,4)	7 (10,3)
	Negativo	26(38,2)	35(51,5)	61 (89,7)
Total		30 (44,1)	38(55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.464

Tabla 31 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 1.

		Colonización Crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 1	Positivo	11(17,1)	14(21,7)	25 (38,8)
	Negativo	19 (27,9)	24 (35,3)	43 (63,2)
Total		30(44,1)	38(55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.988

Tabla 32 Relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 1	Positivo	8 (11,8)	18 (26,4)	26 (38,2)
	Negativo	11 (16,2)	31 (45,6)	42 (61,8)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.683

Tabla 33 Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Aspergillus por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente		Total
		<i>Pseudomonas</i>		
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 1	Positivo	0 (0)	7 (10,3)	7 (10,3)
	Negativo	19 (27,9)	42 (61,8)	61 (89,7)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.082

Tabla 34 Relación entre colonización intermitente previa por Pseudomonas y aislamiento de Pneumocystis por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente		Total
		<i>Pseudomonas</i>		
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 1	Positivo	7 (10,3)	18 (26,5)	25 (36,8)
	Negativo	12 (17,6)	31 (45,6)	43 (63,2)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.993

Tabla 35 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 3	Positivo	8 (11,8)	9 (13,2)	17 (25)
	Negativo	13 (19,1)	16 (23,5)	29 (42,6)
	No realizado	9 (13,3)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		30 (44,2)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.924

Tabla 36 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 3	Positivo	1 (1,45)	1 (1,45)	2 (2,9)
	Negativo	20 (29,4)	24 (35,3)	44 (64,7)
	No realizado	9 (13,3)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		30 (44,2)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.927

Tabla 37 Relación entre colonización crónica previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 3	Positivo	11 (16,2)	10 (14,7)	21 (30,9)
	Negativo	14 (20,6)	23 (33,8)	37 (54,4)
	No realizado	5 (7,35)	5 (7,35)	10 (14,7)
Total		30 (44,2)	38 (55,9)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.518

Tabla 38 Relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 3	Positivo	7 (10,3)	10 (14,7)	17 (25)
	Negativo	7 (10,3)	22 (32,3)	29 (42,6)
	No realizado	5 (7,4)	17 (19,1)	22 (32,4)
Total		19 (27,9)	49 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.371

Tabla 39 Relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 3	Positivo	0(0)	2(2,9)	2(2,9)
	Negativo	14(20,6)	30(44,1)	44(64,7)
	No realizado	5 (7,4)	17 (25)	22(32,4)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.496

Tabla 40 Relación entre colonización intermitente previa por *Pseudomonas* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Pseudomonas</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 3	Positivo	5 (7,35)	16 (23,5)	21 (30,9)
	Negativo	12 (17,6)	25 (36,8)	37 (54,4)
	No realizado	2 (2,9)	8 (11,8)	10 (14,7)
Total		19 (27,9)	49 (72,1)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.650

Tabla 41 Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento por cultivo convencional en visita 1.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 1	Positivo	1 (1,5)	14 (20,6)	15 (22,1)
	Negativo	21 (30,9)	32 (47,1)	53 (77,9)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p por Chi-cuadrado: 0,016.

Tabla 42 Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento por metagenómica en visita 1.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 1	Positivo	15 (22,1)	31 (45,6)	46 (67,6)
	Negativo	7 (10,3)	15 (22,1)	22 (32,4)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.948

Tabla 43 Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento por cultivo convencional en visita 1.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 1	Positivo	5 (7,4)	10 (14,7)	15 (22,1)
	Negativo	17 (25,0)	36 (52,9)	53 (77,9)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado.0.927

Tabla 44 Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamiento por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 1	Positivo	13 (19,1)	33 (48,5)	46 (67,6)
	Negativo	9 (13,2)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado.0.297

Tabla 45 Relación entre I evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 1 y 2 y la colonización crónica previa por Staphylococcus.

	Colonización crónica		Total
	<i>Staphylococcus</i>		
	Positivo	Negativo	
Negativo persistente	3 (13,6)	8 (17,4)	11 (16,2)
Adquisición cepa	4 (18,2)	5 (10,9)	9 (13,2)
Pérdida cepa	5 (22,7)	10 (21,7)	15 (22,1)
Positivo persistente	10 (45,5)	21 (45,5)	31 (45,6)
No realizado	0 (0)	2 (4,3)	2 (2,9)
Total	22 (100)	46 (100)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la columna. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.874

Tabla 46 Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 2 y 3 y la colonización crónica previa por Staphylococcus.

	Colonización crónica		Total
	<i>Staphylococcus</i>		
	Positivo	Negativo	
Negativo persistente	1 (4,5)	4 (8,7)	5 (7,4)
Adquisición cepa	5 (22,7)	6 (13,0)	11 (16,2)
Pérdida cepa	4 (18,2)	7 (15,2)	11 (16,2)
Positivo persistente	6 (27,3)	13 (28,3)	19 (29,7)
No realizado	6 (27,3)	16 (34,8)	22 (32,4)
Total	22 (100)	46 (100)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la columna. Valor p no significativo por Chi-cuadrado. 0.769

Tabla 47 Relación entre la evolución de la microbiota fúngica por metagenómica entre visita 1 y 3 y la colonización previa por Staphylococcus.

	Colonización crónica		Total
	<i>Staphylococcus</i>		
	Positivo	Negativo	
Negativo persistente	2 (9,1)	2 (4,3)	4 (5,9)
Adquisición cepa	2 (9,1)	4 (8,7)	6 (8,8)
Pérdida cepa	6 (27,3)	16 (34,8)	22 (32,4)
Positivo persistente	9 (40,9)	15 (32,6)	24 (35,3)
No realizado	3 (13,6)	9 (19,6)	12 (17,6)
Total	22 (100)	46 (100)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la columna. Valor p no significativo por Chi-cuadrado: 0.793

Tabla 48 Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento por cultivo convencional en visita 2.

		Colonización crónica		Total
		<i>Staphylococcus</i>		
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 2	Positivo	1 (1,5)	31 (45,6)	32 (47,1)
	Negativo	21 (30,9)	13 (19,1)	34 (50)
	No realizado	0 (0)	2 (2,9)	2 (2,9)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado: 0.019

Tabla 49 Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamiento por cultivo convencional en visita 3.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 3	Positivo	3 (4,4)	16 (23,5)	19 (27,9)
	Negativo	19 (27,9)	28 (41,2)	47 (69,1)
		0 (0)	2 (2,9)	2 (2,9)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.055

Tabla 50 Relación entre colonización crónica previa por Staphylococcus y aislamientos por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 3	Positivo	11 (16,2)	19 (27,9)	30 (44,1)
	Negativo	5 (7,3)	11 (16,2)	16 (23,5)
		6 (8,8)	16 (23,6)	22 (32,4)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68(100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado: 0.713

Tabla 51 Relación entre colonización intermitente previa por Staphylococcus y aislamientos por cultivo en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Cultivo visita 3	Positivo	8 (11,7)	11 (16,2)	19 (27,9)
	Negativo	14 (20,6)	33 (48,5)	47 (69,1)
	No realizado	0 (0)	2 (2,9)	2 (2,9)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.336

Tabla 52 Relación entre colonización crónica intermitente previa por Staphylococcus y aislamientos por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
Metagenómica visita 3	Positivo	10 (14,7)	20 (29,4)	30 (44,1)
	Negativo	3 (4,4)	13 (19,1)	16 (23,5)
	No realizado	9 (13,3)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.295

Tabla 53 Relación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 1.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 1	Positivo	5 (7,4)	21 (30,9)	26 (38,2)
	Negativo	17 (25)	25 (36,8)	42 (61,8)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.069

Tabla 54. Relación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 1.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 1	Positivo	3 (4,4)	4 (5,9)	7 (10,3)
	Negativo	19 (27,9)	42 (61,8)	61 (89,7)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.531

Tabla 55. Relación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 1.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 1	Positivo	7 (10,3)	18 (26,5)	25 (36,8)
	Negativo	15 (22)	28 (41,2)	43 (63,2)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.559

Tabla 56. Relación entre colonización intermitente previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 1	Positivo	9 (13,2)	17 (25)	42 (61,8)
	Negativo	13 (19,1)	29 (42,6)	26 (38,2)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.754

Tabla 57. Relación entre colonización intermitente previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 1	Positivo	2 (2,9)	5 (7,4)	7 (10,3)
	Negativo	20 (29,4)	41 (60,3)	61 (89,7)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.821

Tabla 58. Relación entre colonización intermitente previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 1.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 1	Positivo	10 (14,7)	15 (22,1)	25 (36,8)
	Negativo	12 (17,6)	31 (45,6)	43 (63,2)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.304

Tabla 59. Relación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 2.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 2	Positivo	3 (4,4)	0 (0)	3 (4,4)
	Negativo	19 (27,9)	44 (64,7)	63 (92,6)
	No realizado	0 (0)	2 (2,9)	2 (2,9)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.025

Tabla 60. Relación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 3	Positivo	5 (7,4)	12 (17,6)	17 (25)
	Negativo	11 (16,2)	18 (26,4)	29 (42,6)
	No realizado	6 (8,8)	16 (23,6)	22 (32,4)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.691

Tabla 61. Relación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 3	Positivo	1 (1,45)	1 (1,45)	2(2,9)
	Negativo	15 (22,1)	29 (42,6)	44 (64,7)
	No realizado	6 (8,8)	16 (25,6)	22 (32,4)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.739

Tabla 62. Relación entre colonización crónica previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 3	Positivo	4 (5,9)	17 (25)	21 (30,9)
	Negativo	16 (23,5)	21 (30,9)	37 (54,4)
	No realizado	2 (2,9)	8 (11,8)	10 (14,7)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.111

Tabla 63. Relación entre colonización intermitente previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 3	Positivo	7 (10,3)	10 (14,7)	17 (25)
	Negativo	6 (8,8)	23 (33,8)	29 (42,6)
	No realizado	9 (13,3)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.208

Tabla 64. Relación entre colonización intermitente previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 3	Positivo	0(0)	2 (2,9)	2 (2,9)
	Negativo	13 (19,1)	31 (45,6)	44 (64,7)
	No realizado	9 (13,3)	13 (19,1)	22 (32,4)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.396

Tabla 65. Relación entre colonización intermitente previa por *Staphylococcus* y aislamiento de *Pneumocystis* por metagenómica en visita 3.

		Colonización intermitente <i>Staphylococcus</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Pneumocystis</i> visita 3	Positivo	7 (10,3)	14 (20,6)	21 (30,9)
	Negativo	12 (17,6)	25 (36,8)	37 (54,4)
	No realizado	3 (4,4)	7 (10,3)	10 (14,7)
Total		22 (32,4)	46 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.983

Tabla 66. Relación entre colonización crónica previa por *Serratia* y aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica en visita 2.

		Colonización crónica <i>Serratia</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Aspergillus</i> visita 2	Positivo	1 (1,5)	2 (2,9)	3 (4,4)
	Negativo	1 (1,5)	62 (91,1)	63 (92,6)
	No realizado	0 (0)	2 (2,9)	2 (2,9)
Total		2 (3,2)	66 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.006

Tabla 67. Relación entre colonización crónica previa por *Serratia* y aislamiento de *Candida* por metagenómica en visita 3.

		Colonización crónica <i>Serratia</i>		Total
		Positivo	Negativo	
<i>Candida</i> visita 3	Positivo	2 (2,9)	15 (22,1)	17 (25)
	Negativo	0 (0)	29 (42,6)	29 (42,6)
	No realizado	0 (0)	22 (2,9)	22 (32,4)
Total		2 (2,9)	66 (67,6)	68 (100)

Datos expresados en frecuencias absolutas (relativas). Porcentajes expresados con respecto a la cohorte completa. Valor p no significativo por Chi-cuadrado:0.045

Objetivo 4. Analizar los hallazgos microbiológicos con las mutaciones presentes en CTFR y los parámetros clínicos.

La evolución funcional de la FVC y el FEV₁ durante el año de seguimiento está reflejado en la Figura 20 para la FVC y en la Figura 21 para el FEV₁. En ambas medidas se observa una variabilidad que sigue una distribución normal. En el gráfico, se intuye que la mayor parte de la población tiene una variabilidad aproximada en la FVC y el FEV₁ entre +/- 250 ml.

La relación entre los resultados de la metagenómica en visita 1 y variables clínicas basales está recogida en la Figura 20. Evolución funcional de la FVC durante el año de seguimiento.

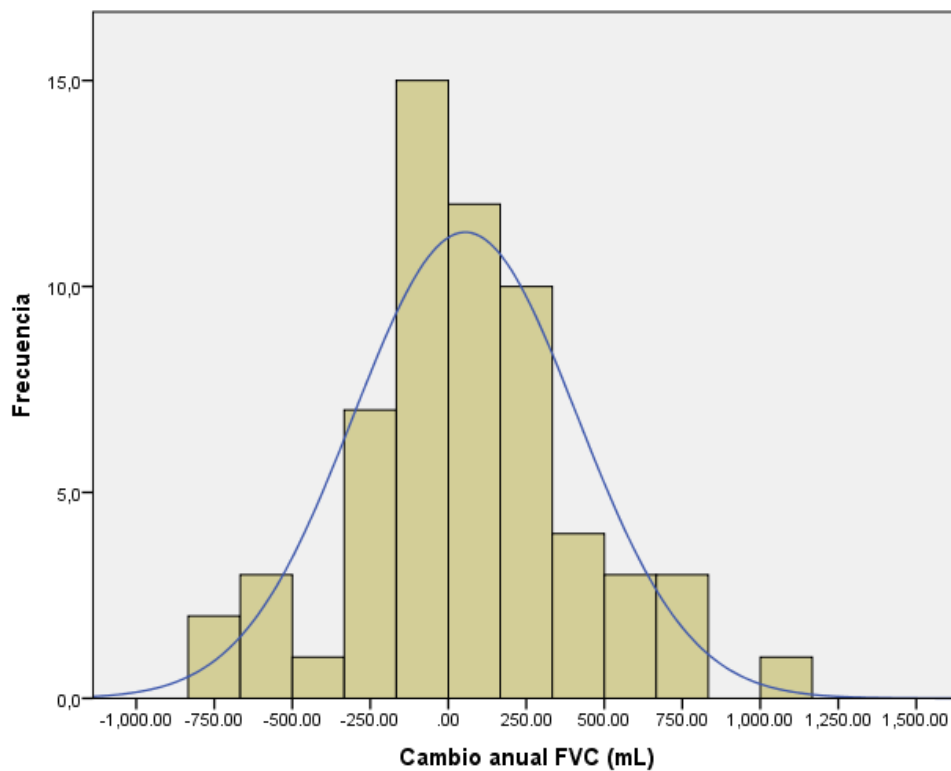
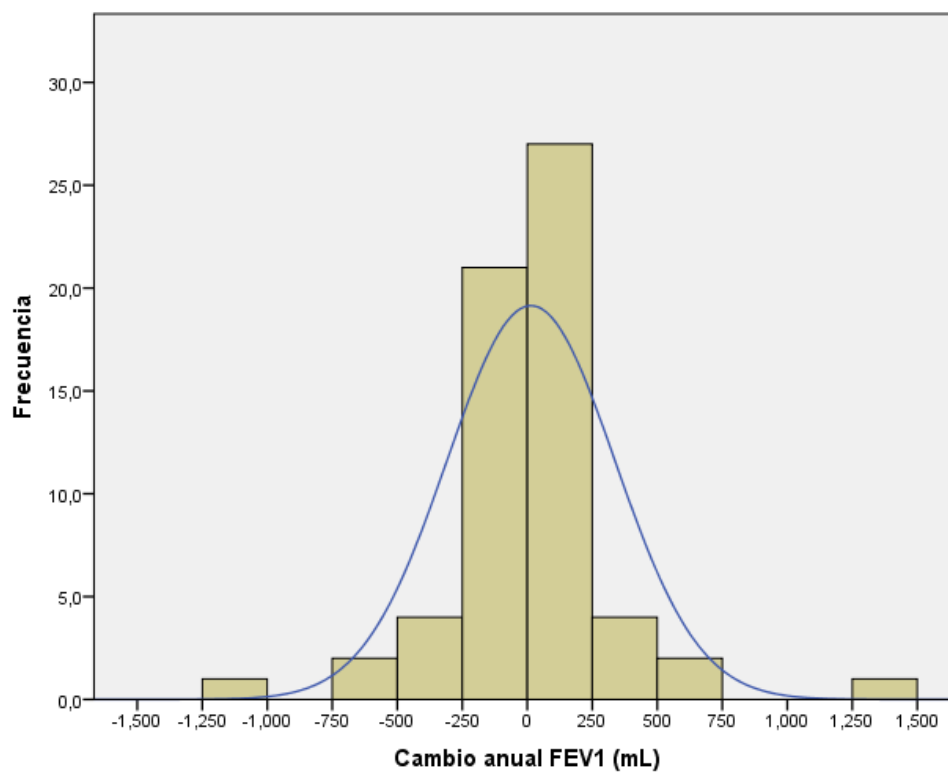


Figura 21. Evolución funcional del FEV₁ durante el año de seguimiento.



. Las relaciones que aparecen cercanas a la significación estadística fueron el sexo, la FVC en valor absoluto, el FEV₁ en valor absoluto, el tratamiento en los 6 meses previos con ICS o el tratamiento con Azitromicina oral de manera pautaada en los 6 meses previos.

La relación entre los resultados de la metagenómica en visita 2 con respecto a visita 1 y las variables clínicas están reflejadas en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** En este caso las relaciones que son cercanas a la significación estadística fueron el sexo, la mutación Gly542* en heterocigosis, el nivel sérico de IgE Totaly el tratamiento con Azitromicina oral de manera pautaada en los 6 meses previos. Mientras que el FEV₁ en valor absoluto y el número de eosinófilos sanguíneos presentaron una asociación estadísticamente significativa. (Valor de p 0,039 y 0,040 respectivamente).

En la Tabla 70, se muestra la relación entre los resultados de la metagenómica en la visita 3 con respecto a la visita 2 y las variables clínicas. Aquellas variables que presentan una relación cercana a la significación estadística fueron exacerbaciones en el año siguiente, la mutación Gly542* en heterocigosis, niveles séricos de IgGA. *fumigatus* y número de eosinófilos en sangre periférica.

La relación entre los resultados de la metagenómica en visita 3 con respecto a visita 1 y las variables clínicas está representada en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Las siguientes variables mostraron una relación cercana a la significación estadística fueron exacerbaciones al año siguiente y la comorbilidad asociada a la FQ, insuficiencia pancreática. El uso de antibiótico oral los 6 meses previos, niveles séricos de IgE Total e IgGA.*fumigatus* muestran una asociación estadísticamente significativa (valor de p <0,001, p <0,001 y p 0.047 respectivamente).

La relación entre los resultados de la metagenómica para *Candida* en la visita 3 con respecto a la visita 1 y variables clínicas se presentan en la Tabla 72. La comorbilidad asociada a la FQ, intolerancia a la glucosa, Δ IMC y Δ FEV₁/FVC presentaron una relación cercana a la significación estadística.

En la Tabla 73, se observa la relación entre los resultados de la metagenómica para *Pneumocystis* en la visita 3 con respecto a la visita 1 y variables clínicas. En ella podemos ver que muestran una relación cercana a la significación estadística en FEV₁/FVC, Δ FVC en valores absoluto, Hemoglobina y el tratamiento con Azitromicina oral de manera pautada en los 6 meses previos.

Figura 20. Evolución funcional de la FVC durante el año de seguimiento.

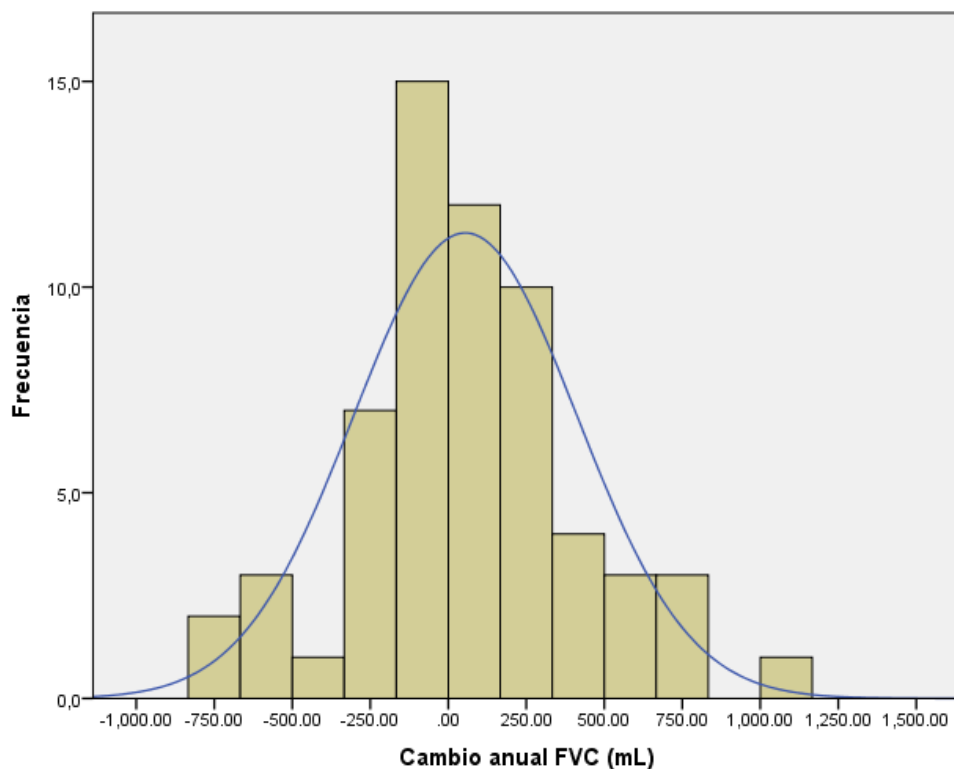


Figura 21. Evolución funcional del FEV₁ durante el año de seguimiento.

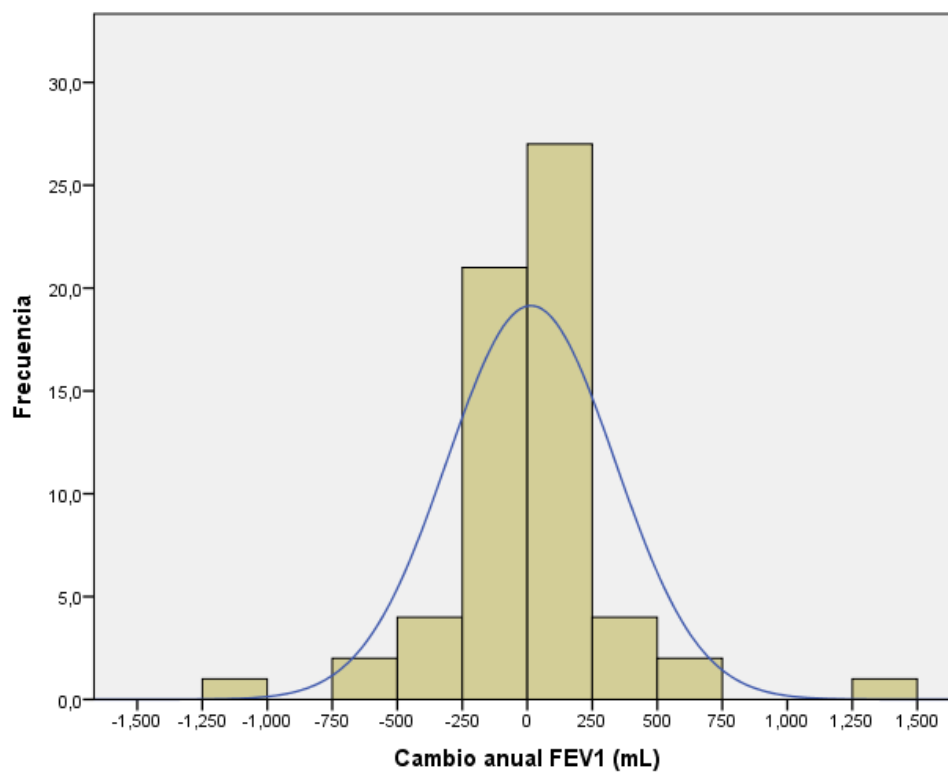


Tabla 68. Relación entre los resultados de la metagenómica en visita 1 y variables clínicas basales.

Característica clínicas		Metagenómica visita 1		Valor p*
		Positivo	Negativo	
Datos clínicos	Edad (años)	20 (9)	23 (11)	0,376
	Sexo (hombres)	17 (37,0)	13 (59,1)	0,085
	IMC (kg/m ²)	19,1 (3,3)	19,4 (2,9)	0,681
	Índice BHALLA	14,6 (6,1)	14,9 (5,4)	0,846
	Exacerbaciones año previo	3,4 (2,3)	2,7 (2,1)	0,261
	Exacerbaciones año siguiente	3,9 (2,6)	3,1 (2,4)	0,200
Mutaciones	Phe508del homocigoto	16 (34,8)	8 (36,4)	0,898
	Phe508del heterocigoto	19 (41,3)	9 (40,9)	0,975
	Gly542* homocigoto	0 (0)	0 (0)	NS
	Gly542* heterocigoto	7 (15,2)	3 (13,6)	0,863
	Arg334Trp homocigoto	0 (0)	0 (0)	NS
	Arg334Trp heterocigoto	5 (10,9)	4 (18,2)	0,405
Comorbilidades	Insuficiencia pancreática	34 (73,9)	12 (54,5)	0,110
	DMRFQ	9 (19,6)	1 (4,5)	0,102
	Intolerancia a la glucosa	21 (45,7)	11 (50,0)	0,737
	Hepatopatía asociada a la FQ	8 (17,4)	4 (18,2)	0,936
	ABPA	2 (4,3)	1 (4,5)	0,970
Espirometría	FVC (ml)	2433 (914)	3017 (1371)	0,080
	FVC (%)	76,9 (20,2)	82,1 (27,3)	0,383
	FEV ₁ (ml)	1504 (617)	2020 (1128)	0,055
	FEV ₁ (%)	57,1 (21,7)	64,8 (29,9)	0,225
	FEV ₁ /FVC	61,3 (11,1)	63,8 (11,9)	0,405

Característica clínicas		Metagenómica visita 1		Valor p*
		Positivo	Negativo	
Pruebas analíticas	IgE Total (KU/l)	362 (827)	636 (1122)	0,318
	IgE m ³ A. <i>fumigatus</i> (KUA/l)	8,8 (22,4)	10,9 (22,5)	0,715
	IgGA. <i>fumigatus</i> (mgA/l)	55,3 (40,1)	50,4 (36,6)	0,638
	Hemoglobina (g/dl)	13,7 (1,2)	13,9 (1,1)	0,658
	Leucocitos (x10 ⁹ /l)	9,1 (3,1)	8,6 (1,9)	0,593
	Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	5,4 (2,7)	5,1 (1,6)	0,554
	Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,235
	Creatinina (mg/dl)	0,61 (0,2)	0,66 (0,1)	0,331
Tratamientos previos	Corticoides inhalados	21 (45,7)	4 (18,2)	0,028
	Corticoides orales	1 (2,2)	0 (0)	0,486
	Antibiótico oral	39 (84,8)	19 (86,4)	0,863
	Antibiótico inhalado	39 (84,8)	17 (77,3)	0,447
	Antibiótico intravenoso	8 (17,4)	2 (9,1)	0,366
	Azitromicina oral	23 (50,0)	6 (27,3)	0,076

Datos expresados en media (desviación estándar) o frecuencias absolutas (relativas), según la naturaleza de la variable. Porcentajes referidos por columnas.

* Calculado mediante Chi-cuadrado o t de Student para datos independientes según la naturaleza de la variable. Se marcan en gris las relaciones con una p < 0,1.

IMC: índice de masa corporal. ABPA: Aspergilosis broncopulmonar alérgica. FVC: Capacidad vital forzada. FEV₁: volumen espirado forzado en el primer segundo.

Tabla 69. Relación entre los resultados de la metagenómica en visita 2 con respecto a visita 1 y las variables clínicas.

Característica clínicas	Metagenómica en visita 2 con respecto a la visita 1				Valor p*	
	Negativos (n=11)	Adquiere (n=9)	Pierde (n=15)	Positivos (n=31)		
Datos clínicos	Edad (años)	24,7 (13,0)	20,3 (9,4)	22,2 (8,3)	20,1 (9,4)	0,583
	Sexo (hombres)	8 (72,7) [†]	5 (55,6)	3 (20,0) [†]	14 (45,2)	0,055
	IMC (kg/m ²)	19,6 (3,4)	19,6 (2,4)	19,2 (3,2)	19,1 (3,3)	0,969
	Índice BHALLA	15,1 (4,2)	16,8 (5,2)	12,7 (6,8)	15,6 (5,6)	0,322
	Exacerbaciones año previo	2,2 (1,5)	2,5 (2,4)	3,1 (2,2)	3,5 (2,3)	0,382
	Exacerbaciones año siguiente	3,1 (1,8)	2,8 (3,1)	4,0 (2,8)	3,9 (2,5)	0,632
Mutaciones	Phe508del homocigoto	3 (27,3)	4 (44,4)	3 (20,0)	13 (41,9)	0,426
	Phe508del heterocigoto	5 (45,5)	4 (44,4)	7 (46,7)	12 (38,7)	0,952
	Gly542* heterocigoto	1 (9,1)	1 (11,1)	5 (33,3) [†]	2 (6,5)	0,088
	Arg334Trp heterocigoto	2 (18,2)	1 (11,1)	1 (6,7)	4 (12,9)	0,844
Comorbilidades	Insuficiencia pancreática	6 (54,5)	5 (55,6)	13 (86,7)	21 (67,7)	0,265
	Diabetes mellitus	0 (0)	1 (11,1)	5 (33,3)	4 (12,9)	0,109
	Intolerancia a la glucosa	7 (63,6)	2 (22,2)	8 (53,3)	13 (41,9)	0,266
	Hepatopatía asociada a la FQ	2 (18,2)	1 (11,1)	3 (20,0)	5 (16,1)	0,951
	ABPA	0 (0)	1 (11,1)	0 (0)	2 (6,5)	0,495
Espirometría	FVC (ml)	3346 (1012)	3281 (1622)	2477 (924)	2548 (1029)	0,082
	FVC (%)	85,2 (17,3)	88,6 (24,1)	73,7 (20,1)	77,7 (23,9)	0,365
	FEV ₁ (ml)	2229 (878)	2230 (1334)	1582 (687)	1532 (710)	0,039
	FEV ₁ (%)	66,7 (21,4)	71,5 (25,6)	53,5 (19,4)	56,4 (25,3)	0,213
	FEV ₁ /FVC	64,9 (10,9)	66,2 (10,1)	60,6 (10,9)	60,3 (13,2)	0,523

Característica clínicas		Metagenómica en visita 2 con respecto a la visita 1				Valor p*
		Negativos (n=11)	Adquiere (n=9)	Pierde (n=15)	Positivos (n=31)	
Pruebas analíticas	IgE Total (KU/l)	429 (531)	371 (658)	82 (79)	312 (228)	0,240
	IgE m ³ A. <i>fumigatus</i> (KUA/l)	9,8 (21,9)	9,3 (17,4)	0,68 (0,63)	7,4 (8,4)	0,684
	IgGA. <i>fumigatus</i> (mgA/l)	37,7 (32,7)	42,0 (24,8)	76,7 (69,5)	49,1 (48,9)	0,532
	Hemoglobina (g/dl)	14,1 (1,2)	14,3 (2,0)	13,5 (1,0)	13,9 (1,4)	0,733
	Leucocitos (x10 ⁹ /l)	8,9 (2,1)	8,6 (1,4)	9,8 (2,0)	8,8 (2,8)	0,698
	Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	5,1 (1,5)	5,9 (1,4)	6,4 (2,2)	5,3 (2,3)	0,473
	Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,3 (0,1)	0,1 (0,8)	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,040
	Creatinina (mg/dl)	0,7 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,2)	0,6 (0,1)	0,486
Tratamientos previos	Corticoides inhalados	2 (18,2)	2 (22,2)	8 (53,3)	13 (41,9)	0,213
	Corticoides orales	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3,2)	0,766
	Antibiótico oral	10 (90,9)	7 (77,8)	13 (86,7)	26 (83,9)	0,867
	Antibiótico inhalado	9 (81,8)	6 (66,7)	12 (80,0)	27 (87,1)	0,572
	Antibiótico intravenoso	1 (9,1)	0 (0)	2 (13,3)	6 (19,4)	0,480
	Azitromicina oral	1 (9,1) [†]	3 (33,3)	8 (53,3)	15 (48,8)	0,090

Datos expresados en media (desviación estándar) o frecuencias absolutas (relativas), según la naturaleza de la variable. Porcentajes referidos por columnas.* Calculado mediante prueba de ANOVA para datos independientes según la naturaleza de la variable.[†] p < 0,05 según corrección de Bonferroni o Chi-cuadrado. Se marcan en gris las relaciones con una p < 0,1. IMC: índice de masa corporal. ABPA: Aspergilosis broncopulmonar alérgica. FVC: Capacidad vital forzada. FEV₁: volumen espirado forzado en el primer segundo.

Tabla 70. Relación entre los resultados de la metagenómica en visita 3 con respecto a la visita 2 y variables clínicas.

Característica clínicas	Metagenómica en visita 3 respecto a la visita 2				Valor p*	
	Negativos (n=5)	Adquiere (n=11)	Pierde (n=11)	Positivos (n=19)		
Datos clínicos	Edad (años)	25,8 (4,4)	20,4 (9,5)	23,0 (9,1)	19,3 (9,3)	0,456
	Sexo (hombres)	1 (20,0)	4 (36,4)	6 (54,5)	9 (47,4)	0,570
	IMC (kg/m ²)	21,5 (2,5)	18,3 (2,9)	20,2 (2,2)	19,3 (3,7)	0,319
	Índice BHALLA	13,6 (4,5)	12,4 (6,2)	16,6 (4,4)	16,2 (5,1)	0,209
	Exacerbaciones año previo	1,6 (0,8)	4,0 (2,2)	3,1 (1,8)	3,6 (2,8)	0,283
	Exacerbaciones año siguiente	2,0 (0)	4,7 (2,8)	2,6 (1,7)	4,5 (2,8)	0,079
Mutaciones	Phe508del homocigoto	1 (20,0)	4 (36,4)	4 (36,4)	9 (47,4)	0,710
	Phe508del heterocigoto	2 (40,0)	5 (45,5)	2 (18,2)	8 (42,1)	0,542
	Gly542* heterocigoto	2 (40,0)	2 (18,2)	2 (18,2)	0 (0) [†]	0,087
	Arg334Trp heterocigoto	0 (0)	1 (9,1)	1 (9,1)	3 (15,8)	0,764
Comorbilidades	Insuficiencia pancreática	0 (0)	0 (0)	2 (18,2)	1 (5,3)	0,306
	DMRFQ	1 (20,0)	3 (27,3)	2 (18,2)	3 (15,8)	0,896
	Intolerancia a la glucosa	3 (60,0)	6 (54,5)	5 (45,5)	6 (31,6)	0,529
	Hepatopatía asociada a la FQ	1 (20,0)	3 (27,3)	1 (9,1)	2 (10,5)	0,578
	ABPA	4 (80,0)	9 (81,8)	6 (54,5)	13 (68,4)	0,528
Espirometría	FVC (ml)	2877 (648)	2276 (569)	3296 (1471)	2576 (931)	0,134
	FVC (%)	76,9 (11,8)	72,0 (14,1)	85,2 (25,8)	77,7 (23,2)	0,568
	FEV ₁ (ml)	1692 (449)	1431 (532)	2098 (1285)	1631 (643)	0,307
	FEV ₁ (%)	53,6 (16,6)	50,8 (15,5)	64,2 (31,2)	58,5 (22,6)	0,585
	FEV ₁ /FVC	58,9 (9,8)	60,5 (10,6)	61,4 (13,9)	64,1 (13,3)	0,823

Característica clínicas	Metagenómica en visita 3 respecto a la visita 2				Valor p*	
	Negativos (n=5)	Adquiere (n=11)	Pierde (n=11)	Positivos (n=19)		
Pruebas analíticas	IgE Total (KU/l)	205 (239)	215 (173)	1066 (1410)	238 (170)	0,685
	IgE m ³ A. <i>fumigatus</i> (KUA/l)	4,1 (4,8)	6,6 (6,0)	15,1 (13,8)	5,1 (6,1)	0,530
	IgGA. <i>fumigatus</i> (mgA/l)	71,9 (52,8)	51,1 (33,7)	107 (51,3)	45,4 (30,3)	0,052
	Hemoglobina (g/dl)	13,7 (0,5)	14,1 (1,2)	14,0 (1,7)	13,6 (1,9)	0,854
	Leucocitos (x10 ⁹ /l)	7,5 (0,1)	8,6 (2,5)	8,7 (2,3)	8,5 (3,9)	0,955
	Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	4,5 (0,8)	5,0 (1,8)	5,5 (2,3)	5,0 (3,5)	0,955
	Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,5 (0,2)	0,2 (0,1)	0,2 (0,1)	0,4 (0,2)	0,087
	Creatinina (mg/dl)	0,7 (0,2)	0,6 (0,1)	0,6 (0,2)	0,6 (0,1)	0,564
Tratamientos previos	Corticoides inhalados	3 (75,0)	4 (36,4)	5 (45,5)	8 (44,4)	0,619
	Corticoides orales	0 (0)	0 (0)	1 (9,1)	1 (5,6)	0,734
	Antibiótico oral	4 (80,0)	11 (100)	8 (72,7)	18 (94,7)	0,142
	Antibiótico inhalado	4 (80,0)	10 (90,9)	10 (90,9)	16 (84,2)	0,887
	Antibiótico intravenoso	1 (20,0)	1 (9,1)	2 (18,2)	3 (15,8)	0,921
	Azitromicina oral	4 (80,0)	8 (72,7)	6 (54,5)	13 (68,4)	0,720

Datos expresados en media (desviación estándar) o frecuencias absolutas (relativas), según la naturaleza de la variable. Porcentajes referidos por columnas.* Calculado mediante prueba de ANOVA para datos independientes según la naturaleza de la variable. † p < 0,05 según corrección de Bonferroni o Chi-cuadrado. Se marcan en gris las relaciones con una p < 0,1. IMC: índice de masa corporal. ABPA: Aspergilosis broncopulmonar alérgica. FVC: Capacidad vital forzada. FEV₁: volumen espirado forzado en el primer segundo.

Tabla 71. Relación entre los resultados de la metagenómica en visita 3 con respecto a la visita 1 y variables clínicas.

Característica clínicas	Metagenómica en visita 3 respecto a la visita 1				Valor p*	
	Negativos (n=4)	Adquiere (n=6)	Pierde (n=22)	Positivos (n=24)		
Datos clínicos	Edad (años)	19,2 (10,8)	21,3 (8,8)	22,3 (8,4)	19,3 (9,5)	0,714
	Sexo (hombres)	3 (75,0)	3 (50,0)	7 (31,8)	10 (41,7)	0,410
	Índice BHALLA	18,0 (3,1)	12,8 (5,0)	14,0 (6,4)	15,1 (6,0)	0,555
	Exacerbaciones año previo	3,0 (2,9)	2,6 (1,6)	2,6 (1,4)	4,0 (2,7)	0,304
	Exacerbaciones año siguiente	1,5 (1,9)	4,3 (2,7)	3,1 (2,1)	4,6 (2,8)	0,076
Mutaciones	Phe508del homocigoto	2 (50,0)	2 (33,3)	5 (22,7)	11 (45,8)	0,383
	Phe508del heterocigoto	1 (25,0)	4 (66,7)	10 (45,5)	9 (37,5)	0,522
	Gly542* heterocigoto	1 (25,0)	0 (0)	5 (22,7)	2 (8,7)	0,341
	Arg334Trp heterocigoto	0 (0)	2 (33,3)	3 (13,6)	2 (8,3)	0,339
Comorbilidades	Insuficiencia pancreática	3 (75,0)	2 (33,3) [†]	14 (63,6)	20 (83,3)	0,098
	DMRFQ	1 (25,0)	0 (0)	3 (13,6)	6 (25,0)	0,467
	Intolerancia a la glucosa	2 (50,0)	2 (33,3)	11 (50,0)	10 (41,7)	0,874
	Hepatopatía asociada a la FQ	0 (0)	1 (16,7)	4 (18,2)	4 (16,7)	0,838
	ABPA	0 (0)	1 (16,7)	2 (9,1)	0 (0)	0,295
Espirometría	IMC (kg/m ²)	20,4 (1,7)	19,0 (1,4)	19,8 (2,8)	18,9 (3,8)	0,576
	FVC (ml)	3963 (2542)	2575 (540)	2647 (942)	2426 (877)	0,721
	FVC (%)	96,2 (32,8)	70,0 (15,6)	76,5 (19,9)	77,0 (21,1)	0,366
	FEV ₁ (ml)	2676 (2159)	1681 (559)	1539 (745)	1518 (619)	0,797
	FEV ₁ (%)	77,6 (41,3)	52,4 (12,8)	51,6 (22,4)	56,3 (21,9)	0,314
	FEV ₁ /FVC	65,3 (17,3)	64,1 (9,4)	56,7 (12,5)	62,3 (13,0)	0,380

Característica clínicas		Metagenómica en visita 3 respecto a la visita 1				Valor p*	
		Negativos (n=4)	Adquiere (n=6)	Pierde (n=22)	Positivos (n=24)		
Cambios espirometría	Δ IMC (kg/m ²)	-0,2 (0,8)	0,4 (1,4)	0,8 (1,1)	-0,07 (1,7)	0,220	
	Δ FVC (ml)	20 (105)	-123 (439)	57 (358)	137 (371)	0,485	
	Δ FVC (%)	-17,1 (23,0)	-2,8 (10,0)	0,2 (10,7)	-0,1 (13,2)	0,162	
	Δ FEV ₁ (ml)	36 (172)	-73 (352)	-8 (329)	73 (334)	0,748	
	Δ FEV ₁ (%)	-15,1 (22,8)	-1,3 (9,3)	-2,9 (10,3)	-2,9 (16,9)	0,535	
	Δ FEV ₁ /FVC	1,8 (2,1)	1,9 (4,4)	-1,9 (10,7)	-0,6 (8,1)	0,766	
Pruebas analíticas	IgE Total (KU/l)	3463 ()	245 (163)	311 (387)	222 (174)	0,000	
	IgE m ³ A. <i>fumigatus</i> (KUA/l)	23,8 ()	3,5 (2,0)	6,6 (9,7)	6,3 (6,5)	0,196	
	IgGA. <i>fumigatus</i> (mgA/l)	133 ()	46,1 (27,7)	88,4 (51,4)	48,5 (32,9)	0,047	
	Hemoglobina (g/dl)	14,6 (2,4)	12,9 (1,3)	13,4 (1,3)	14,1 (1,6)	0,346	
	Leucocitos (x10 ⁹ /l)	10,7 (1,7)	9,6 (3,1)	8,0 (2,0)	8,3 (3,3)	0,369	
	Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	7,4 (2,1)	5,3 (2,3)	4,9 (1,7)	4,9 (3,0)	0,424	
	Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,1 (0,2)	0,2 (0,1)	0,3 (0,2)	0,3 (0,2)	0,579	
	Creatinina (mg/dl)	0,5 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,576	
	Tratamientos previos	Corticoides inhalados	1 (25,0)	3 (50,0)	10 (47,6)	9 (39,1)	0,808
		Corticoides orales	0 (0)	1 (16,7)	1 (4,8)	0 (0)	0,269
Antibiótico oral		1 (25,0) [†]	6 (100)	21 (95,5)	23 (95,8)	<0,001	
Antibiótico inhalado		3 (75,0)	5 (83,3)	18 (81,8)	21 (87,5)	0,911	
Antibiótico intravenoso		0 (0)	1 (16,7)	8 (36,4)	3 (12,5)	0,156	
Azitromicina oral		1 (25,0)	5 (83,3)	16 (72,7)	16 (66,7)	0,233	

Datos expresados en media (desviación estándar) o frecuencias absolutas (relativas), según la naturaleza de la variable. Porcentajes referidos por columnas. * Calculado mediante prueba de ANOVA para datos independientes según la naturaleza de la variable. † $p < 0,05$ según corrección de Bonferroni o Chi-cuadrado. Se marcan en gris las relaciones con una $p < 0,1$. IMC: índice de masa corporal. ABPA: Aspergilosis broncopulmonar alérgica. FVC: Capacidad vital forzada. FEV₁: volumen espirado forzado en el primer segundo.

Tabla 72. Relación entre los resultados de la metagenómica para *Candida* en visita 3 con respecto a la visita 1 y variables clínicas.

Característica clínicas	Metagenómica para <i>Candida</i> en visita 3 respecto a la visita 1				Valor p*	
	Negativos (n=18)	Adquiere (n=6)	Pierde (n=11)	Positivos (n=11)		
Datos clínicos	Edad (años)	19,4 (8,0)	21,0 (9,6)	25,1 (8,1)	20,2 (10,6)	0,405
	Sexo (hombres)	7 (38,9)	5 (83,3)	3 (27,3)	5 (45,5)	0,156
	Índice BHALLA	15,6 (5,5)	13,0 (3,5)	14,9 (4,9)	15,3 (6,6)	0,784
	Exacerbaciones año previo	3,0 (1,9)	3,3 (2,0)	3,7 (3,1)	3,9 (2,3)	0,758
	Exacerbaciones año siguiente	3,1 (2,1)	3,8 (2,5)	4,3 (2,9)	4,5 (3,1)	0,551
Mutaciones	Phe508del homocigoto	7 (38,9)	4 (66,7)	2 (18,2)	5 (45,5)	0,249
	Phe508del heterocigoto	6 (33,3)	2 (33,3)	6 (54,5)	3 (27,3)	0,564
	Gly542* heterocigoto	2 (11,1)	0 (0)	2 (18,2)	2 (18,2)	0,689
	Arg334Trp heterocigoto	2 (11,1)	0 (0)	2 (18,2)	1 (9,1)	0,711
Comorbilidades	Insuficiencia pancreática	10 (55,6)	6 (100)	7 (63,6)	9 (81,8)	0,154
	DMRFQ	1 (5,6)	1 (16,7)	2 (27,3)	4 (36,4)	0,198
	Intolerancia a la glucosa	9 (50,0)	5 (83,3)	3 (27,3)	3 (27,3)	0,088
	Hepatopatía asociada a la FQ	1 (5,6)	2 (33,3)	3 (27,3)	1 (9,1)	0,223
	ABPA	3 (16,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,172
Espirometría	IMC (kg/m ²)	19,0 (2,2)	19,8 (4,5)	20,0 (3,1)	19,4 (3,9)	0,898
	FVC (ml)	2831 (1308)	2810 (1055)	2886 (550)	2288 (870)	0,515
	FVC (%)	76,8 (25,0)	80,6 (13,3)	81,6 (15,0)	75,1 (23,6)	0,901
	FEV ₁ (ml)	1840 (1134)	1861 (901)	1664 (319)	1421 (436)	0,395
	FEV ₁ (%)	58,9 (29,5)	60,8 (14,9)	55,7 (14,9)	54,8 (22,5)	0,903
	FEV ₁ /FVC	63,2 (13,3)	66,3 (13,2)	58,4 (8,6)	60,8 (13,2)	0,635

Característica clínicas		Metagenómica para <i>Candida</i> en visita 3				Valor p*
		respecto a la visita 1				
		Negativos (n=18)	Adquiere (n=6)	Pierde (n=11)	Positivos (n=11)	
Cambios espirometría	Δ IMC (kg/m ²)	0,3 (1,2)	-0,8 (2,1)	1,3 (1,9)	-0,06 (0,9)	0,052
	Δ FVC (ml)	188 (429)	-33 (323)	172 (247)	3 (334)	0,412
	Δ FVC (%)	-1,3 (15,0)	-2,7 (7,5)	4,3 (5,3)	-4,2 (15,6)	0,507
	Δ FEV ₁ (ml)	161 (394)	-26 (288)	93 (157)	-51 (230)	0,290
	Δ FEV ₁ (%)	-1,1 (16,7)	-1,8 (8,0)	2,4 (3,9)	-9,3 (19,5)	0,225
	Δ FEV ₁ /FVC	2,4 (6,0)	2,8 (8,4)	0,2 (4,5)	-3,8 (6,6)	0,075
Pruebas analíticas	IgE Total (KU/l)	774 (1144)	258 (182)	146 (169)	247 (1700)	0,336
	IgE m ³ A. <i>fumigatus</i> (KUA/l)	11,5 (11,4)	6,1 (7,2)	3,1 (4,3)	7,7 (7,9)	0,342
	IgGA. <i>fumigatus</i> (mgA/l)	82,8 (52,5)	36,8 (23,6)	61,4 (44,8)	60,7 (38,6)	0,346
	Hemoglobina (g/dl)	14,0 (1,6)	14,2 (1,6)	12,8 (0,8)	14,4 (1,6)	0,198
	Leucocitos (x10 ⁹ /l)	8,5 (2,5)	10,4 (4,2)	7,0 (3,1)	8,4 (1,3)	0,216
	Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	5,0 (2,3)	6,2 (4,1)	4,4 (2,6)	4,8 (1,1)	0,641
	Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,2 (0,2)	0,3 (0,2)	0,3 (0,2)	0,3 (0,2)	0,946
	Creatinina (mg/dl)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,813
Tratamientos previos	Corticoides inhalados	8 (47,1)	2 (33,3)	5 (50,0)	5 (45,5)	0,928
	Corticoides orales	2 (11,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,344
	Antibiótico oral	14 (77,8)	6 (100)	11 (100)	10 (90,9)	0,212
	Antibiótico inhalado	15 (83,3)	6 (100)	10 (90,9)	9 (81,8)	0,679
	Antibiótico intravenoso	2 (11,1)	1 (16,7)	3 (27,3)	1 (9,1)	0,614
	Azitromicina oral	11 (61,1)	3 (50,0)	8 (72,7)	9 (81,8)	0,506

Datos expresados en media (desviación estándar) o frecuencias absolutas (relativas), según la naturaleza de la variable. Porcentajes referidos por

columnas. * Calculado mediante prueba de ANOVA para datos independientes según la naturaleza de la variable. † $p < 0,05$ según corrección de Bonferroni o Chi-cuadrado. Se marcan en gris las relaciones con una $p < 0,1$. IMC: índice de masa corporal. ABPA: Aspergilosis broncopulmonar alérgica. FVC: Capacidad vital forzada. FEV₁: volumen espirado forzado en el primer segundo.

Tabla 73. Relación entre los resultados de la metagenómica para *Pneumocystis* en visita 3 con respecto a la visita 1 y variables clínicas.

Característica clínicas	Metagenómica para <i>Pneumocystis</i> en visita 3 respecto a la visita 1				Valor p*	
	Negativos (n=26)	Adquiere (n=12)	Pierde (n=11)	Positivos (n=9)		
Datos clínicos	Edad (años)	20,3 (10,1)	20,1 (9,2)	21,2 (10,5)	23,6 (8,1)	0,828
	Sexo (hombres)	13 (50,0)	3 (25,0)	6 (54,5)	3 (33,3)	0,385
	Índice BHALLA	15,9 (4,8)	13,4 (4,9)	15,6 (5,8)	15,4 (7,8)	0,688
	Exacerbaciones año previo	3,3 (2,1)	3,5 (3,0)	3,4 (2,2)	2,8 (1,4)	0,916
	Exacerbaciones año siguiente	3,6 (2,3)	3,9 (3,1)	3,7 (2,7)	4,3 (3,0)	0,934
Mutaciones	Phe508del homocigoto	8 (30,8)	3 (25,0)	6 (54,5)	3 (33,3)	0,457
	Phe508del heterocigoto	13 (50,0)	6 (50,0)	5 (45,5)	3 (33,3)	0,845
	Gly542* heterocigoto	3 (11,5)	3 (25,0)	0 (0)	2 (22,2)	0,299
	Arg334Trp heterocigoto	4 (15,4)	2 (16,7)	0 (0)	1 (11,1)	0,567
Comorbilidades	Insuficiencia pancreática	15 (57,7)	9 (75,0)	10 (90,9)	6 (66,7)	0,236
	DMRFQ	3 (11,5)	0 (0)	2 (18,2)	3 (33,3)	0,165
	Intolerancia a la glucosa	12 (46,2)	7 (58,3)	5 (45,5)	2 (22,2)	0,429
	Hepatopatía asociada a la FQ	4 (15,4)	4 (33,3)	0 (0)	2 (22,2)	0,196
	ABPA	2 (7,7)	0 (0)	0 (0)	1 (11,1)	0,524
Espirometría	IMC (kg/m ²)	19,3 (3,1)	17,9 (2,8)	20,5 (3,8)	20,3 (3,0)	0,242
	FVC (ml)	2644 (976)	2562 (845)	2567 (1019)	2896 (776)	0,865
	FVC (%)	78,4 (23,2)	78,4 (18,2)	77,8 (17,2)	81,5 (15,9)	0,981
	FEV ₁ (ml)	1627 (733)	1474 (724)	1704 (790)	1984 (424)	0,437
	FEV ₁ (%)	57,9 (25,6)	48,8 (17,1)	60,2 (18,0)	64,5 (17,6)	0,269
	FEV ₁ /FVC	61,3 (13,0)	54,1 (11,4)	66,9 (10,6)	68,4 (9,6)	0,040

Característica clínicas	Metagenómica para <i>Pneumocystis</i> en visita 3 respecto a la visita 1				Valor p*	
	Negativos	Adquiere	Pierde	Positivos		
	(n=26)	(n=12)	(n=11)	(n=9)		
Cambios espirometría	Δ IMC (kg/m ²)	0,3 (1,1)	-0,2 (1,9)	0,1 (0,9)	1,0 (2,0)	0,275
	Δ FVC (ml)	195 (410)	-51 (276)	-138 (357)	128 (276)	0,063
	Δ FVC (%)	2,4 (14,8)	-0,1 (6,4)	-9,8 (15,8)	1,0 (6,2)	0,244
	Δ FEV ₁ (ml)	120 (337)	-88 (210)	-117 (457)	50 (278)	0,178
	Δ FEV ₁ (%)	1,1 (13,9)	-7,0 (15,1)	-8,5 (18,0)	-3,5 (13,9)	0,279
	Δ FEV ₁ /FVC	-0,05 (10,3)	-2,6 (5,7)	-0,05 (10,3)	1,7 (3,7)	0,768
Pruebas analíticas	IgE Total (KU/l)	600 (928)	180 (180)	144 (169)	159 (190)	0,300
	IgE m ³ A. <i>fumigatus</i> (KUA/l)	9,7 (10,5)	3,0 (3,6)	2,6 (2,4)	6,8 (8,2)	0,196
	IgGA. <i>fumigatus</i> (mgA/l)	66,3 (58,2)	67,9 (27,0)	43,6 (37,2)	69,2 (21,3)	0,523
	Hemoglobina (g/dl)	13,9 (1,1)	13,5 (0,8)	14,7 (1,5)	12,6 (1,4)	0,120
	Leucocitos (x10 ⁹ /l)	8,3 (2,7)	9,2 (4,2)	8,6 (1,6)	7,0 (1,6)	0,459
	Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	4,6 (2,0)	6,2 (3,7)	5,0 (1,7)	3,7 (1,0)	0,145
	Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,3 (0,2)	0,2 (0,1)	0,3 (0,2)	0,2 (0,2)	0,425
Creatinina (mg/dl)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,932	
Tratamientos previos	Corticoides inhalados	10 (41,7)	5 (41,7)	4 (36,4)	4 (44,4)	0,985
	Corticoides orales	1 (4,2)	0 (0)	0 (0)	1 (11,1)	0,501
	Antibiótico oral	25 (96,2)	12 (100)	10 (90,9)	8 (88,9)	0,628
	Antibiótico inhalado	21 (80,8)	11 (97,1)	9 (81,8)	8 (88,9)	0,816
	Antibiótico intravenoso	4 (15,4)	3 (25,0)	2 (18,2)	2 (22,2)	0,904
	Azitromicina oral	17 (65,4)	11 (91,7)	3 (27,3) [†]	7 (77,8)	0,010

Datos expresados en media (desviación estándar) o frecuencias absolutas (relativas), según la naturaleza de la variable. Porcentajes referidos por

columnas. * Calculado mediante prueba de ANOVA para datos independientes según la naturaleza de la variable. † $p < 0,05$ según corrección de Bonferroni o Chi-cuadrado. Se marcan en gris las relaciones con una $p < 0,1$. IMC: índice de masa corporal. ABPA: Aspergilosis broncopulmonar alérgica. FVC: Capacidad vital forzada. FEV₁: volumen espirado forzado en el primer segundo.

Discusión.

Mensaje fundamental de la tesis

Tradicionalmente, se ha relacionado que la enfermedad pulmonar de la FQ ha sido producida por microorganismos tales como *S.aureus*, *P.aeruginosa* o *H.influenzae*. No obstante, debemos tener presente que el aislamiento de hongos en la vía aérea de los pacientes con FQ está incrementándose debido al empleo de nuevas técnicas mucho más sensibles para su detección.

En la presente Tesis Doctoral, mediante el empleo de técnicas moleculares, PCR-TR para la detección de *Pneumocystis* y PCR nested para la detección de otros hongos, hemos estudiado que formando parte de la microbiota de la vía aérea de los pacientes con FQ encontramos una diversidad de microorganismos del reino hongo (microbiota fúngica).

Los hongos que con mayor frecuencia han sido aislados pertenecen al filo *Ascomtblaycota*(*Pneumocystis*, *Candida*, *Aspergillus*). Sin embargo, el tipo de hongo aislado, así como la frecuencia de aislamiento varía en función de la técnica empleada (cultivo convencional o técnica metagenómica). El género *Candida*, y en concreto la especie *C.albicans* es el hongo más frecuente aislado mediante técnica molecular, permaneciéndose estable en los tres periodos de tiempos de seguimiento estudiados. Sin embargo, mediante cultivo convencional de esputo los más prevalentes son el género *Aspergillus* y *levaduras spp*(sin especificar género), con una frecuencia similar de aislamiento durante el año de seguimiento. *Pneumocystis* para el cual hemos empleado una técnica específica para su detección también se ha mantenido estable durante los tres periodos.

Al analizar la implicación de la presencia de hongos con las características clínicas, hemos observado que el sexo masculino conlleva a un mayor riesgo para colonizarse por hongos y que los pacientes con metagenómica positiva

para hongos tienen un FEV₁ inferior que los no presentan hongos en el esputo. No obstante, los resultados no han sido estadísticamente significativo. Sin embargo, si hemos encontrado una relación significativa entre la colonización crónica por *S.aureus* y aislamiento de hongos por cultivo convencional.

Fortalezas del estudio

Podemos destacar de nuestro estudio, el elevado número de pacientes reclutados. Existen estudios con un menor número de pacientes como el realizado por Delhaes et al donde se analizaron un total de 8 muestras de esputo de 4 pacientes con FQ, dos muestras por cada paciente separadas un año entre sí (53). Posteriormente se realizó un estudio con 6 pacientes con FQ hospitalizados por exacerbación, recogándose una muestra previa a la instauración del tratamiento antibiótico y tras el cumplimiento de este (58). Más recientemente en 2015, Losada et al, llevo a cabo un estudio con 30 pacientes, los cuales fueron divididos entre suficientes (11 pacientes) e insuficientes pancreáticos (19 pacientes). A todos se analizó mediante técnica molecular el esputo inducido extraído tras la nebulización de suero salino hipertónico al 3% (59). Aunque en todos ellos encontraron las especies fúngicas más frecuentes encontradas en los pacientes con FQ (*Aspergillus* y *Candida*), otros géneros fúngicos diferentes fueron identificados en cada uno de ellos, pudiendo estar relacionado la distribución geográfica pues cada estudio fue realizado en un país diferente. Por tanto, a pesar de tratarse de 68 pacientes FQ en total considerando que la FQ es una enfermedad rara y si lo comparamos con estos estudios donde han reclutado un menor tamaño muestral, podemos considerarlo como una muestra adecuada.

Una ventaja de este estudio es su diseño prospectivo, permitiéndonos realizar análisis de variables analíticas, funcionales y microbiológicas en tres periodos de tiempo.

Limitaciones del estudio

Son varias las limitaciones que encontramos en este estudio y que a continuación se detallan:

Una limitación muy importante de nuestro estudio ha sido las pérdidas de pacientes en la última visita del seguimiento, debido a la disponibilidad de muestras de esputo insuficientes para poder realizar el análisis molecular.

En cuanto al tipo de muestra utilizada, el cultivo de esputo pudiera ser considerada que no es una muestra verdaderamente representativa de la microbiota del pulmón, siendo fácilmente contaminada. Se consideran muestras representativas el lavado broncoalveolar o aspirado bronquial(60) que se obtienen mediante la realización de una broncoscopia. Esta técnica requiere de un personal entrenado y una infraestructura especial. Además, los pacientes requieren una sedo analgesia adecuada. No obstante, las técnicas moleculares que se han empleado nos permiten detectar un mayor número de especies que no pueden ser identificadas por las técnicas convencionales, reduciendo de esa forma nuestra limitación.

Debemos de tener en cuenta como una limitación, que no realizamos un estudio previo a los pacientes por si estos presentaban una colonización crónica de la cavidad oral por *Candida* que pudiera contaminar los esputos al ser recogidos.

Otra limitación que destacar, es no aplicar el análisis molecular para la detección de hongos en muestras de esputo de sujetos sanos de nuestra misma área, y poder compararlos con los hallazgos encontrados en los pacientes FQ. No obstante, ya que se tratan de hongos oportunistas y que su crecimiento depende de las características del clima y del área geográfica (61,62) los resultados que obtendríamos en nuestro grupo control quizás fuesen diferentes con los encontrados en otros países.

Por otro lado, la técnica de laboratorio tiene una serie de consideraciones metodológicas para tener en cuenta, son:

Elevado coste de la técnica molecular. Aproximadamente el coste de 20 muestras tiene un valor de 1000 euros, limitando su uso en la práctica clínica habitual.

Estar en posesión de una infraestructura especial que contengan las herramientas (termociclador, refrigerador, pipetas, campana extractora, mechero bunsen...) y los reactivos necesarios para la realización de los diferentes análisis. Por dicho motivo, esta técnica es empleada en el ámbito de la investigación y no en la práctica clínica diaria. En el futuro necesitaríamos disponer de test diagnósticos más sencillos y económicos para aplicarlo en el día a día. Tal es así que en algunos congresos se ha planteado la cooperación entre organización nacional de pacientes y las sociedades de fibrosis quística (62).

La PCR es una técnica muy sensible y que genera falsos positivos, principalmente por problemas en la contaminación de las muestras, pudiendo generar un problema al interpretar nuestros resultados. No obstante, para

evitar esta limitación en nuestro estudio hemos trabajado con meticulosidad y usando medidas preventivas: limpiando las superficies de trabajo antes y después de trabajar en ellas, usando puntas de pipetas desechables y controles negativos (agua estéril). Además de la realización de controles de calidad, como se muestra en la metodología.

Resultados comparados con otros estudios

En los últimos años se han realizados estudios centrados en el conocimiento de la microbiota pulmonar, enfocando su atención en el componente bacteriano, dejando a un lado a los virus y hongos. Aunque son pocos los estudios que disponemos sobre microbiota fúngica y poco conocimiento al respecto, algunos autores afirman que la investigación de la microbiota fúngica es una “emergencia universal” (63).

El interés científico por este tema está justificado por varias razones.

En primer lugar, la vía aérea respiratoria es la principal puerta de entrada de numerosos microorganismos (virus, bacterias y hongos). Particularmente en los pacientes con FQ, la mutación del gen CFTR resulta en un aclaramiento mucociliar ineficaz, la acumulación de moco espeso y poco hidratado lo que va a favorecer a un buen ecosistema para el crecimiento de estos microorganismos. Las esporas de hongos representan más de 50.000 esporas por metro cúbico de aire durante la temporada de hongos(64). Son las características de los microorganismos inhalados junto con la respuesta inmune del huésped, los que van a determinar si los hongos son eliminados o colonizarán el tracto respiratorio, generando o no enfermedad.

En segundo lugar, las infecciones fúngicas son una amenaza de salud mundial, con alta mortalidad, difícil de diagnosticar y tratar que ha ido en aumento con el

paso de los años. Uno de los principales factores favorecedores de este aumento es debido al aumento del uso de los antibióticos y corticoides (62).

En tercer lugar, existen vínculos comunes entre los hongos y las enfermedades respiratorias crónicas (asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, FQ), como parte de la interacción huésped-patógeno-ambiente continua desde el nacimiento hasta la muerte. Incluso algunos estudios han demostrado que la presencia de hongos en el tracto respiratorio de los pacientes con FQ conlleva un empeoramiento de la enfermedad (65,66).

Las principales especies fúngicas son difíciles de cultivar en los medios de cultivo convencionales. Debido al desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación, como aquellas que identifican el ARN ribosomal de hongos, podemos identificar a la microbiota fúngica. No obstante, son pocos los estudios centrados al estudio de la microbiota fúngica en pacientes con FQ (53,67–71), la mayoría de ellos realizan un estudio de la microbiota pulmonar (incluyendo bacterias y hongos).

La microbiota (incluyendo la microbiota fúngica) tiene su propia composición siendo diferente y única en cada individuo. Es probable que esta vaya modificándose según la enfermedad y con la presencia de las agudizaciones bronquiales (67). Se cree que esta puede tener un papel fundamental en la alteración de la función pulmonar.

De los estudios disponibles en la actualidad para el estudio de la microbiota podemos destacar los realizados por los siguientes autores.

Delhaes y su equipo (53) llevaron a cabo un estudio sobre la microbiota pulmonar de pacientes FQ, analizando 8 muestras de esputos de 4 sujetos con FQ. Las

muestras de esputos fueron recogidas con un periodo de intervalo de un año y con el paciente en fase estable. El análisis de las muestras de esputo se realizó por pirosecuenciación con el cebador ITS2 para hongos y por PCR anidada con cebadores específicos para *P.jirovecii*. Los hongos más frecuentemente encontrados fueron el género *Candida* *Aspergillus*. Otros hongos encontrados fueron *P.jirovecii*, *Geotrichum* *sp*, *Malassezia* *sp*. El 60% de las especies o géneros del reino hongo no fueron identificadas por los cultivos convencionales.

En otro estudio realizado por Willner et al (53) se reclutó un total de 6 pacientes con FQ recogiendo una muestra de esputo previo a la toma de antibioterapia por exacerbación y al finalizar el tratamiento. Las técnicas empleadas para la detección de los hongos fue la pirosecuenciación con el cebador ITS1. Los géneros más frecuentes encontrados fueron *Candida* *Malassezia* *sp* permaneciendo estables en los dos tiempos estudiados.

Un estudio más numeroso fue el realizado por Kramer et al (72) en el que se incluyeron un total de 56 pacientes con FQ, de los cuales 13 fueron seguidos en dos o tres periodos de tiempo. El análisis fue realizado mediante pirosecuenciación con el cebador ITS1. El género más frecuente encontrado fue *Candida*. Otras especies mucho menos frecuentes halladas fueron *Aspergillus* (en un paciente con ABPA) y *Scedosporium*.

Harrison et al (69) realizó un estudio reclutando a 56 pacientes FQ y 5 pacientes con bronquiectasias no FQ. Las muestras se analizaron con cultivo convencional y con una nueva técnica molecular llamada a “bar-coded high-throughput sequencing” (HTS). Se observó que los cultivos convencionales solo aíslan el 25% de la microbiota fúngica, sin embargo, HTS permitía la identificación de especies fúngicas en todas las muestras.

Más recientemente, Hauser et al (71) realizó un estudio incluyendo a solo dos pacientes con FQ, obtuvo una frecuencia de colonización del género *Candida*, del 100% al utilizar los cebadores ITS2 en la amplificación por PCR del ADN extraído de esputo.

Por tanto, los distintos tipos de técnicas moleculares disponibles hoy nos permiten ampliar nuestro conocimiento sobre los componentes de la microbiota fúngica en la vía aérea de los pacientes con FQ. Además, con la combinación de varias técnicas aumentamos la posibilidad de identificar más géneros fúngicos obteniendo una información más fiable de los verdaderos componentes de la microbiota en pacientes con FQ.

Frecuencia de hongos detectados

Candida

Candida está presente en diferentes partes del organismo, como la cavidad oral del ser humano formando parte de la flora habitual tanto en individuos sanos como en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas (73). Aunque el género fue considerado como un comensal con baja virulencia, en las últimas décadas se ha anunciado que existe un incremento de infecciones en pacientes con FQ producidas por el género *Candida*(74–76).

La especie más frecuente es *C. albicans* responsables del 95% de las infecciones producidas por el género *Candida*(66) mientras que el resto de infecciones son causadas por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. Los tipos de infecciones causadas pueden ser a nivel local, como la candidiasis oral o vulvovaginal, o infecciones sistemas como las ocurridas en el periodo post-trasplante (77,78).

Los pacientes con FQ tienen muchos factores de riesgo que aumentan la susceptibilidad a ser colonizados por *Candida*, incluyendo salivación alterada,

diabetes, uso de corticoides inhalados y de antibioterapia prolongada (66,76). Algunos autores defienden la hipótesis de que *C. albicans* y *C. parapsilosis* se encuentran formando parte de la cavidad oral y que pueden migrar colonizando y persistiendo en la vía aérea inferior de los pacientes con FQ (76).

La prevalencia del género *Candida* en el esputo de pacientes con FQ oscilan entre el 40-60% (79,80). En nuestro estudio, el hongo mayormente detectado con técnica moleculares fue el género *Candida* (cuyas frecuencias oscilan entre 38,2%, 37,9% y 37% en función del tiempo examinado), siendo la especie predominante *C. albicans* (23,4% de media). Nuestros hallazgos coinciden con los encontrados por Kramer R et al (72) donde *C. albicans* y *C. dubliniensis* fueron las especies dominantes en el grupo de FQ, con 44.4% y 23.6% respectivamente, seguido por *C. parapsilosis*, con 13.8% y por Willger S et al (67). La frecuencia del género *Candida* en el estudio de Hauser es del 100%, no obstante, hay que tener en cuenta que el estudio fue realizado en solo dos pacientes de ahí esas altas frecuencias (71).

Sin embargo, mediante cultivo convencional el género *Candida* en nuestra muestra es menos identificado (frecuencias de 5,9%, 3% y 9,1%) que en el estudio de Chotirmall et al. en el que la colonización por *C. albicans* estaba presente en el 49,9% de su muestra (66), incluso al realizar el seguimiento de 11 años observó que el 20,2% de su población presentaba una colonización crónica y el 29,2% una colonización intermitente. Siendo así incluso, superior a nuestros aislamientos.

El estudio realizado por Noni et al que incluyó a un total de 121 pacientes FQ se objetivó que la frecuencia de *Candida* alcanza el 49,4% en el esputo utilizando el cultivo convencional (74). Al igual que en el estudio realizado en 2013 por Güngör

et al, donde observo que en el 62,5% de sus pacientes con FQ (30 pacientes de 48, 56 muestras de 148) se aisló *C.albicans*(81). Estas cifras son superiores incluso a los estudios presentados con anterioridad (66,74) pero hay que tener en cuenta que de las 56 muestras, 16 provenían de esputo y 40 de frotis faríngeo, por lo que esta frecuencia podría estar sobreestimada, ya que los frotis podrían estar contaminado por los hongos de la cavidad oral.

Aspergillus

Aspergillus es el hongo filamentosos que con más frecuencia se aísla en pacientes con FQ y en particular la especie *A. fumigatus*. *A. flavus*, *A. niger* y *A. nidulans* son comúnmente detectados, pero estos suelen ser transitorios en comparación con *A. fumigatus* y *A. terreus* que son colonizadores crónicos de la vía aérea (82).

La colonización por estos hongos está favorecida por la presencia de una barrera anatómica defectuosa que dificultan el aclaramiento mucociliar de los hongos inhalados. Debido a su tamaño pequeño (2-5 micras), algunas esporas de *Aspergillus* entran directamente en las vías respiratorias pequeñas y en los sacos alveolares pasan por alto las grandes vías respiratorias y por tanto las respuestas inmunológicas, favoreciendo su proliferación (83). Incluso algunos estudios defienden que *A. fumigatus* es responsable del daño directo sobre la mucosa respiratoria (84). Además *A. fumigatus* producen metabolitos y enzimas proteolíticas que son capaces de alterar el aclaramiento mucociliar o de inhibir la fagocitosis.

Es fundamental diferenciar una colonización por *Aspergillus*, de una infección. El aislamiento de hongos en más del 50% de las muestras respiratorias obtenidas en un año, indican fuertemente la presencia de colonización o de infección solo

si se acompaña de caída de la función pulmonar o frecuentes exacerbaciones respiratorias que no responde a tratamiento antibiótico(85).

Los factores clínicos asociados al aislamiento de *Aspergillus* en pacientes FQ es un debate. Se ha sugerido que la edad avanzada (86–88), peor función pulmonar (87,88) y tratamiento con azitromicina (89) son factores de riesgo para el aislamiento de hongos filamentosos en pacientes FQ.

La principal manifestación clínica que produce este género en FQ es ABPA, sin embargo, los aspergilomas y la enfermedad invasiva también puede ocurrir. El aspergiloma definido como una acumulación de hifas en una cavidad pulmonar pre-existente principalmente en lóbulos superiores es poco frecuente en FQ pero se pueden dar casos aislados(90). La enfermedad invasiva se presenta en dos formas principales: aspergilosis pulmonar invasiva o aspergilosis invasiva (se producen en pacientes inmunosuprimidos). La primera se observa con mayor frecuencia en la FQ aunque ambas formas son generalmente raras(85).

La ABPA es consecuencia de una reacción de hipersensibilidad a la exposición del antígeno de *Aspergillus*. El principal agente causal es *A. fumigatus*, aunque se han descrito algunos casos por *A. terreus*. La prevalencia de ABPA en sujetos con FQ varía del 1-10% (91). Estas variaciones son debidas principalmente a que se han usado diferentes definiciones y por tanto distintos criterios para el diagnóstico de ABPA. La prevalencia del estudio realizado por Chortimall et al. (85) fue del 12%. Si lo comparamos con nuestra prevalencia (4,4%) es inferior a la encontrada por Chotirmall, pero nos encontramos dentro del rango.

En un estudio realizado por el grupo español de Maíz et al, con una muestra muy similar a la nuestra (66 pacientes con FQ a los cual se les estudio la presencia

de hongos mediante cultivo de esputo o de frotis faríngeo previo tratamiento erradicador de *Candida* en el caso de colonización oral) se observó que en 40 pacientes se aisló al menos un cultivo positivo para *A.fumigatus* en la muestra respiratoria recogida en el periodo de seguimiento (86).En comparación con nuestra muestra, donde a 11 pacientes se les aisló 1 cultivo de esputo positivo de *Aspergillus* mediante cultivo convencional o 9 por técnica molecular en el seguimiento; ellos obtuvieron mayor aislamiento. Dos posibles explicaciones a esta gran diferencia es que en nuestra población sea menos frecuente la presencia de *Aspergillus*(ya que la frecuencia de aislamiento es baja utilizando dos técnicas diferentes) o que las muestras representen diferentes zonas del estado español.

La prevalencia de *A. fumigatus* oscila desde el 16 al 56,7% (92–94) y la *A. terreuses* inferior oscilando entre 1,9 a 6,2% (84).Como se muestran en los resultados la frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* por metagenómica es del 6,4% de media y por cultivo convencional 9,5% de media (siendo la especie predominante *A. fumigatus*) inferior a la prevalencia estimada en otros estudios.

En otro estudio de mayor tamaño realizado en 2009 por Sudfeld et al, con un total de 614 pacientes seguido 5,98 años de media se observó que el porcentaje de pacientes FQ con hongos filamentosos aumentó con el paso del tiempo. En 1997 sólo 2% de pacientes presentaban aislamiento de hongos filamentosos aumentando la incidencia en 2007 a 28,7%. El hongo más frecuente fue *A. fumigatus* presente en 223 individuos (36,3%) otras especies de *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* fueron descubiertos en 160 (26.1%) individuos (87).

Pneumocystis

Pneumocystis es un hongo oportunista con tropismo por el tejido pulmonar y de distribución mundial que causa neumonía en pacientes con inmunosupresión. La

colonización por *Pneumocystis* ha sido descrita en varias enfermedades pulmonares sugiriendo que tiene una importancia clínica (95).

La colonización por *Pneumocystis* no parece ser un factor de riesgo para la neumonía en pacientes con FQ, probablemente debido a que el estado inmunológico de estos pacientes suele ser suficiente para controlar la colonización y prevenir el desarrollo de la enfermedad invasiva como por ejemplo la neumonía (37,44,47).

El empleo de técnicas más sensibles nos ha permitido identificar *Pneumocystis* en 10-40% de pacientes inmunocompetentes con varias enfermedades pulmonares crónicas (43,96). Además, los estudios serológicos llevados a cabo en España han demostrado que los adultos sanos no inmunocomprometidos con frecuencia tienen anticuerpos séricos contra *Pneumocystis* (97), y que el contacto primario suele ocurrir a una edad temprana (98).

Son pocos los estudios los que han evaluado la prevalencia de la colonización por *Pneumocystis* en la población con FQ siendo esta variable en función de la región estudiada. En Alemania se ha estimado que la prevalencia es de 7,4% (43), en España en un estudio realizado por Respalda et al en 2005 la prevalencia fue del 21,5% (44), en un estudio Brasileño realizado por Pederiva et al en 2012 se observó una prevalencia del 38,2% (99) y en último realizado en 2017 en Bretaña (Francia) fue del 2,5% (61). Las frecuencias encontradas en nuestro trabajo (38,8%, 33,3% y 37,5%) son muy similares a las encontradas en el estudio brasileño.

Parece ser que el clima influye en la circulación y en la transmisión de *Pneumocystis* en los pacientes con FQ. Las altas prevalencias se sitúan en

España (clima mediterráneo) y en Brasil (clima subtropical) y las bajas en los climas más fríos, Alemania y Francia (61). Por tanto, esas diferencias en la prevalencia podrían estar influenciadas no sólo por las distintas técnicas empleadas, si no por las diferencias geográficas.

Scedosporium

Scedosporium (87,91) es el segundo hongo filamentoso más frecuente encontrado en la vía aérea de los pacientes FQ. *S. apiospermum* y *S. prolificans* son las especies más importantes.

Las enfermedades asociadas a este género son sinusitis, aspergilomas, neumonía necrotizante así como infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos (100). Además, se han descrito casos de ABPA por *S. apiospermum* (101).

No debemos de ignorar la colonización crónica de las vías respiratorias por este hongo en los pacientes con FQ. De hecho, se ha descrito que la FQ se considera factor de riesgo para la colonización por *Scedosporium* (91). Aunque aún no es bien conocido el mecanismo patogénico parece ser que *S. apiospermum* sin duda contribuye a la reacción inflamatoria y al deterioro progresivo de la función pulmonar debido a la secreción de proteasas y liberación de antígenos polisacáridos y proteínas. Debido a que el hongo es capaz de causar infecciones humanas diseminadas y mala respuesta al tratamiento antifúngico, sería aconsejable evaluarlo críticamente en pacientes con FQ, y en especial aquellos que han sufrido un trasplante pulmonar.

En los estudios realizados sobre la prevalencia de *Scedosporium* muestran una prevalencia más elevada que la encontrada por nosotros. Cimon realizó un estudio

con 128 pacientes de los cuales 11 (8,6%) tenían *Scedosporium* en la vía aérea (101). Estos mismos hallazgos fueron encontrados en dos estudios realizados posteriormente en Australia y en Austria con una prevalencia del 10% (102) y del 6,5% (103), respectivamente. Inferior fue la prevalencia encontrada en un estudio realizado en 11 centros alemanes donde la prevalencia media fue de 3,1% (104). La diferencia en la prevalencia de aislamiento es muy variable en función de las poblaciones estudiadas debido a la diferente metodología empleada.

Estos resultados difieren con los nuestros, donde tan solo en 3 pacientes (1,5% de media) se detectó en cultivo convencional *Scedosporium*, quizás esté en relación con la predominancia de este género en esas regiones.

Pero cómo se introduce este hongo en la vía aérea de los pacientes con FQ si *S. apiospermum* se ha descrito en suelos y agua altamente contaminados es una incógnita (105). Para resolver esta incógnita se realizó un estudio ambiental en los domicilios de seis pacientes con FQ colonizados por *S. apiospermum* y seguidos en el Hospital Universitario Angers (106). Se analizaron el aire y las superficies del dormitorio del paciente, el cuarto de baño, el salón, el suelo del jardín, así como de todas las plantas en maceta presentes en el hogar. Entre las muestras de aire y de superficie, sólo una de un radiador en el dormitorio de un paciente reveló la presencia de *S. apiospermum*. En contraste, de 55 plantas en maceta que fueron muestreadas, se aisló *S. apiospermum* en 36. Por lo tanto, se debe evitar la presencia de plantas en casa de pacientes con FQ.

Al contrario que *S. apiospermum*, *S. prolificans* es conocido principalmente como agente causante de infecciones diseminadas en pacientes con neoplasias hematológicas malignas (107). Sólo se han descritos unos pocos casos en

Australia, España y Estados Unidos, de aislamiento en secreciones respiratorias en pacientes con FQ(102,108–110).

Malassezia

En cuanto al género *Malassezia* en nuestra muestra es poco común, solo fue identificado mediante técnica molecular en un único caso (1 paciente de 66 [1,5%]) en el segundo tiempo de seguimiento. Sin embargo, existe estudios donde la presencia de este género es más frecuente (53,67,70,82). *Malassezia spp* se encuentran con frecuencia en la piel de humanos y de animales principalmente en mamíferos, siendo las especies *M.restricta* y *M.globosa* las más frecuentemente encontradas en la piel de los seres humanos (113). Está relacionado con enfermedades dérmicas como la pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y la psoriasis (114). Requiriendo para su identificación de medios especiales. Estos microorganismo están ganando importancia,y actualmente se reconocen como patógenos infecciosos emergentes(115,116). Se debería de investigar en posteriores estudios si *Malassezia* está viviendo en el pulmón o esa señal proviene del ADN de células muertas.

Cryptococcus

Cryptococcus una levadura oportunista que pertenece al filo Basidiomycota. Su distribución es universal y se encuentra en el suelo, en especial en aquel que es enriquecido por excrementos de palomas. La especie responsable de producir enfermedad en el ser humano es *Cryptococcus neoformans*. Actúa como patógeno oportunista en personas inmunocompetentes (40) produciendo enfermedad en inmunodeprimidos (trasplantados, VIH). Aunque la cryptococcosis es rara que produzca después del trasplante pulmonar es la tercera causa de infección sistémica después del trasplante de órgano sólido(117).

En nuestra población tan solo en 3 pacientes se aisló *Cryptococcus* pudiendo identificar en un único caso la especie, *C. favencens* siendo comparables nuestros resultados con los encontrados en la literatura (53).

Hongos ambientales

Otros hongos, denominados hongos ambientales porque se ubican en el medio ambiente (plantas, agua, suelos, humedades del hogar e incluso alimentos), han sido aislados en nuestra muestra. Dentro de los géneros identificados se encuentran *Peritrichia*, *Rhabostyla*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhodosporium*, *Sacharomyces* entre otros, aunque con baja frecuencia. Ninguno suele estar asociado con consecuencias clínicas en la FQ(85).

Penicillium es identificado casi exclusivamente en el contexto de la FQ como hongo contaminante. Sin embargo, algunas especies como *P. emersonii* pueden colonizar crónicamente las vías respiratorias de los pacientes con FQ.

Este hongo telúrico termofílico, que se caracteriza por ser biverticilado asimétricos y por sus conidias cilíndricas o elipsoidales, fue informada por primera vez en un paciente con FQ en 1999(118). No parecen contribuir al desarrollo de la enfermedad y parece difícil asignar un papel patógeno a este hongo(91).

La prevalencia de este tipo de hongos no está clara, ya que existe dificultad para ser identificados en los laboratorios de microbiología. El rol de los hongos ambientales en la FQ aún no está clarificado.

Función pulmonar y hongos

La influencia que ejercen los hongos sobre el deterioro de la función pulmonar en los pacientes con FQ no está clara. Son varios los estudios que se han realizado para dar respuesta a esta incógnita, siendo los resultados obtenidos

diferentes. Algunos de estos defienden que la presencia de hongos en la vía aérea de los pacientes FQ deterioran la función pulmonar y otros demuestran lo contrario.

Incluso dentro de nuestro estudio observamos esas diferencias. Los pacientes que presentaban hongos en el esputo por metagenómica presentaban una peor función pulmonar que aquellos con ausencia de hongos, rozando la significación estadística en el tiempo basal, con una significación estadística a los 6 meses (pero sólo FEV₁ en ml) y no significativa en el último momento de seguimiento.

Existen estudios realizados por el grupo español de Maíz et al que han analizado la colonización por *Aspergillus* y algunas variables clínicas entre ellas la función pulmonar. En 2002 Maíz et al. (119) reclutó 76 pacientes con FQ cuya edad media era 15,3 ± 8,7 años y un FEV₁ de 72,09 ± 31,28%, se observó que aquellos pacientes con colonización de hongos (*Aspergillus* o *Candida*) y sensibilización positiva, es decir, IgE *A. fumigatus* ≥ 0,35 KU/l o IgE *C. albicans* ≥ 0,35 KU/l, tenían peor función pulmonar que aquellos con ausencia de sensibilización, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos. Hay que tener presente para el análisis de los resultados de este estudio la diferencia existente entre el número de pacientes incluido en el grupo control. Este mismo grupo en 2008 (86) realizó otro estudio con un total de 66 pacientes con FQ con edad media 16,2 ± 8,3 años y un FEV₁ de 72,09 ± 31,28%, mostró que la presencia de *Aspergillus* o de *Candida* en el esputo ni sus inmunorrespuestas específicas IgG, IgA e IgM no están relacionadas con el deterioro de la función pulmonar.

Los resultados difieren a los nuestros, pero hay que tener en cuenta que la población de estos dos estudios es más joven que la nuestra y partían de una mejor función pulmonar.

Es más tarde, cuando Amin et al (120) en su estudio demuestra que el aislamiento de *A. fumigatus* de las vías respiratorias de los niños con FQ (n=37), en ausencia de ABPA, está asociada con un menor FEV₁ y un mayor riesgo de exacerbaciones pulmonares que requieren hospitalización. Sus resultados se podrían argumentar pues aquellos pacientes con más exacerbaciones pulmonares reciben más antibióticos y tienen más colonización por hongos ya que el ajuste para estas variables se debilitó.

Otro estudio contemporáneo al de Amin et al, pero realizado para estudiar la asociación entre *Scedosporium spp* y las variables clínicas, microbiológicas y funcionales de los pacientes con FQ, es el estudio prospectivo de Blyth et al(121). En 57 de 69 pacientes (81,2%) se aislaron hongos filamentosos. *Scedosporium spp* fue identificado mediante cultivo convencional en 8,7% y mediante técnica molecular 17,4%. En el análisis transversal que realizaron no hubo asociación entre la presencia de *Scedosporium spp* y las peores medidas clínicas (como el FEV₁), pero interesantemente hubo una relación inversa entre la presencia de *P. aeruginosa mucoides* y *Scedosporium spp*. También encontraron que la colonización a largo plazo (> 2 años) con *Scedosporium spp* es relativamente estable en el tiempo.

Se han realizado estudios similares para examinar los efectos sobre la función pulmonar de las levaduras como las diversas especies de *Candida* en las vías respiratorias de los pacientes con FQ. Como el estudio observacional prospectivo de Chotirmall (66) con 86 pacientes con FQ que mostró que la adquisición de

Candida se asoció con una disminución y mayor declive del FEV₁ y un mayor número de exacerbaciones pulmonares.

Posteriormente en 2011, Vrankrijker et al. con una cohorte de 259 pacientes con FQ encontró que 61 (23.5%) fueron colonizados por *A. fumigatus* (cumplían criterios de colonización, más de 50% de cultivos positivos de esputo en un año). Realizó un análisis de cohorte retrospectivo en 163 pacientes durante un período de 5 años y los pacientes se agruparon según el número de años en los que cumplieron los criterios de colonización. Este análisis longitudinal no encontró diferencias entre los grupos con respecto a la disminución de la función pulmonar durante el período de estudio(122), así como los que fueron colonizados durante más tiempo tenían mayor edad, tuvieron un FEV₁ basal más bajo, usaron más antibióticos y tuvieron menor puntuación en el IMC.

Fillaux et al, reclutó 251 pacientes con FQ entre 1995 y 2007, de los cuales cumplían criterios de colonización por *Aspergillus* 134. Fueron divididos en tres grupos: pacientes con ABPA (n=34), colonización persistente (n=37) y sensibilización (n=63). Los resultados obtenidos fueron que los tres grupos de pacientes estaban asociados a una significativa mayor disminución del FEV₁ en comparación con el grupo control. Esta asociación fue independiente de otros factores asociados (detección transitoria de *P. aeruginosa*, edad, bajo peso y bajo FEV₁ al inicio del estudio) (123).

En 2015, se ha llevado a cabo un estudio caso control, con 20 pacientes FQ y 60 controles, es decir, 1 caso para 3 controles. El principal objetivo fue la medida de la diferencia en el FEV₁ entre los grupos. Se utilizaron modelos mixtos lineales

para los análisis longitudinales para evaluar la relación entre la colonización crónica de *A. fumigatus* y la función pulmonar durante un período de 7 años y 4 años antes de la fecha de inclusión. Se detectó una diferencia en la función pulmonar a lo largo del período de 7 años después del ajuste para los factores de confusión. Cuatro años antes del tiempo de inclusión, el FEV₁ basal fue el único factor asociado con el curso de la función pulmonar y fue significativamente diferente entre los grupos. Como conclusiones obtuvieron que una disminución del FEV₁ basal parece ser un factor de riesgo para la colonización crónica por *A. fumigatus*, que a su vez puede causar un deterioro más rápido de la función pulmonar(124).

Más recientemente ha sido publicado un estudio observacional retrospectivo con 45 niños con FQ, de los cuales solo 33 tenían una espirometría realizada. Debido a la edad de los pacientes estos no eran capaces de realizar una espirometría. Para el estudio de la colonización crónica por *Aspergillus* se utilizó esputo o lavado broncoalveolar (BAL). Los pacientes fueron divididos en 3 grupos en función del tipo de colonización (no colonizados, colonización intermitente o persistente), encontrando una peor función pulmonar en aquellos pacientes con colonización crónica aunque sin significancia estadística (125). Sin embargo, estos resultados pueden que estén influenciados por la edad de los pacientes, ya que a menor edad menor colonización y por el tamaño muestral. Debido a los diferentes resultados encontrados en los trabajos realizados hasta el momento, son necesarios más estudios para clarificar el papel que juegan los hongos en la función pulmonar.

Tabla 74. Estudios realizados sobre función pulmonar y hongos

Estudio (año)	Tipo de estudio	Grupo (n)	Tipo de muestra	Resultados	Comentarios
Maíz et al.(2002)(119)	Observacional prospectivo	76 FQ	Esputo (cultivo)	Función pulmonar no inferior en los pacientes con sensibilización positiva.	No se estudió las diferencias entre colonizados y no colonizados.
Maíz et al.(2008) (86)	Observacional prospectivo	66 FQ	Esputo (cultivo)	Deterioro no significativo de la función pulmonar	Muestra pequeña en el grupo control. Análisis multivariante
Amin et al. (2010) (65)	Observacional retrospectivo	230 FQ (niños)	Esputo (cultivo)	Deterioro significativo de la función pulmonar	
Blyth et al. (2010) (121)	Observacional prospectivo	69 FQ	Esputo (cultivo y PCR)	Deterioro no significativo de la función pulmonar	
Chotirmall et al. (2010) (66)	Observacional prospectivo	89 FQ	Esputo (cultivo)	Deterioro significativo de la función pulmonar	Análisis multivariante
Vrankrijker et al. (2011) (122)	Observacional retrospectivo	259 FQ (adultos y niños)	Esputo (cultivo)	Deterioro no significativo de la función pulmonar.	Análisis multivariante
Filloux et al. (2012) (123)	Observacional prospectivo	251FQ	Esputo (cultivo)	Deterioro significativo de la función pulmonar	Análisis multivariante
Noni et al. (2015)(124)	Estudio caso-control	20 FQ 60control	Esputo (cultivo)	Deterioro significativo de la función	Ajustado por factores de confusión

				pulmonar	
Saunders et al. (2016) (125)	Observacional retrospectivo	33 FQ niños	BAL + Esputo	Deterioro no significativo de la función pulmonar	

Tratamiento antifúngico en pacientes con FQ

Existe un consenso general sobre la indicación de tratamiento de la infección fúngica en los pacientes con FQ. El tipo de antifúngico empleado, dosis y duración están definidos y detallados en guías de manejo clínico realizadas por la opinión de expertos o en estudios observacionales como es el caso de la guía para el manejo y tratamiento de la ABPA en pacientes con FQ (126) donde nos indican que además de corticoides orales la adición de itraconazol puede ser útil.

Sin embargo, en el caso de la colonización fúngica crónica de la vía aérea se desconoce si requiere tratamiento, la duración del mismo y el tipo de antifúngico a utilizar. Parte del problema está en que se desconoce el efecto que tiene la colonización fúngica sobre la función pulmonar del paciente. Esto, sumado al riesgo teórico del desarrollo de resistencias y la posible alteración de la microbiota; son motivos válidos para que las guías clínicas no consideren el tratamiento en estas circunstancias. No obstante, con las nuevas técnicas moleculares, como las aplicadas en el presente estudio, se prevé un mayor número de aislamientos de especies fúngicas en los pacientes FQ, que hará posible determinar el impacto real en la historia natural de la enfermedad del paciente. Mención aparte merece la posibilidad de la exacerbación de las infecciones bacterianas en pacientes con colonización fúngica, quedando por determinar si la erradicación de estos microorganismos podría mejorar su curso clínico. Estas son cuestiones que surgen a los clínicos en el día a día y que requieren una respuesta para obtener un mejor manejo de los pacientes FQ.

Hasta la fecha son pocos los estudios que se han realizado para investigar la erradicación de los pacientes colonizados por hongos. Como el ensayo clínico aleatorizado doble ciego, placebo controlado realizado para evaluar los efectos del tratamiento antifúngico en la función pulmonar de los pacientes con FQ colonizados por *A. fumigatus* sin evidencia de ABPA. Los pacientes fueron aleatorizados en dos grupos, 18 pacientes recibieron itraconazol oral a 5mg/kg/día y 17 placebo, durante 24 semanas en ambos grupos. Los pacientes tratados con antifúngicos tendieron a presentar exacerbaciones más precozmente (media de días 77) que los pacientes tratados con placebo (media de días 134). Aunque estas diferencias no fueron significativas. No se identificó beneficio clínico del tratamiento con itraconazol, no obstante este estudio fue limitado por su pequeño tamaño muestral y la ausencia de niveles terapéuticos de itraconazol en muchos pacientes(127). Por el contrario, un estudio abierto de un solo centro con 13 pacientes con FQ sugirieron mejoras en la calidad de vida y disminución de las exacerbaciones al tomar itraconazol 400mg diarios durante 6 semanas (128). Al igual que el estudio anterior la muestra es pequeña y la metodología del ensayo es abierto, por lo que hace que la interpretación de los resultados sea más subjetiva.

En cuanto al tipo de antifúngico a emplear ha sido difícil evaluar la utilidad de muchos de ellos. En el caso particular de itraconazol, ha sido difícil evaluar su aplicabilidad en la práctica clínica, considerando verdaderos retos obtener niveles terapéuticos adecuados y evitar efectos secundarios adversos. Por esta razón, algunos autores abogan por el uso de otros azoles como el voriconazol justificando que puede tener un potencial adicional (129). Existen incluso casos clínicos (130), series de casos (131) y un estudio retrospectivo (132) que han utilizado voriconazol nebulizado para la infección por *Scedosporium* siendo bien

tolerado, sin efectos secundarios y manteniendo buenos niveles en plasma. Pero también existen ensayos clínicos que han comprobado los efectos secundarios del voriconazol, como el ensayo clínico realizado en pacientes con FQ donde 18 de 31 pacientes presentó fotosensibilidad asociado al voriconazol(133). Cabe destacar que la mayoría de los estudios realizados a la fecha son de corto tiempo de duración, por lo cual el efecto a largo plazo del tratamiento está aún por definirse.

Una de las preocupaciones del uso de tratamiento antifúngico en pacientes colonizados asintomáticos es la generación de cepas resistentes.

Particularmente en el caso de los azoles existen estudios que lo confirman. En una cohorte francesa de 16 pacientes se observó que el 4,6% de pacientes con FQ y aislamiento de *A. fumigatus* fue menos susceptible al tratamiento con itraconazol y otros azoles (134). Otro estudio francés con una cohorte más amplia (50 pacientes) encontró una prevalencia de aislamiento de *A. fumigatus* resistente a azoles del 8%, identificado las mutaciones que subyacen al desarrollo de estas resistencias(135). En un estudio de 287 pacientes con FQ realizado en Dinamarca con el análisis de una gran cantidad de muestras respiratorias (3336) obtuvieron una prevalencia de resistencia a azoles del 4,5%, siendo comparable con los estudios previos(136).

Son muy escasos los estudios realizados que han estudiado el efecto del tratamiento sobre la colonización fúngica, y entre los encontrados ninguno ha sido sobre la colonización de la vía aérea inferior. Se destaca un estudio prospectivo realizado en 2013 que investigó la colonización por *Candida* mediante el empleo de frotis faringoamigdalares y cultivo de heces en tres

grupos de pacientes, niños con cáncer (45), niños con fibrosis quística (37) y niños sanos (71). En el grupo de los niños con cáncer se observó que en aquellos que habían recibido profilaxis oral con nistatina no presentaron una disminución significativa en las tasas de colonización por *Candida*. Además, cuando se analizaron las muestras (20 faringoamigdalares y 26 fecales de 9 y 11 niños respectivamente) de los pacientes que habían recibido tratamiento antifúngico intravenoso con los que no recibieron, no encontraron diferencias significativas en la colonización por *Candida* (137). Los resultados pueden estar influidos por el tipo de muestra obtenida (frotis amigdalino y heces) y tamaño muestral.

Aún quedan muchas respuestas inconclusas. Por lo que son requeridos más estudios.

Propuestas de futuro

La presente Tesis Doctoral ha demostrado de manera clara que existe una microbiota fúngica presente en los pacientes con FQ que se mantiene constante en el tiempo. El potencial impacto en la evolución clínica de la enfermedad debe ser abordado de manera prospectiva en el futuro en cohortes de pacientes mayores. La relevancia clínica de este hallazgo tendría claramente una interpretación diferente dependiente del impacto clínico real sobre los pacientes o su influencia pronóstica. De demostrarse que esta microbiota fúngica tiene un impacto clínico cuantificable, el hallazgo pasaría de ser una curiosidad epidemiológica a ser un objetivo que debería concentrar parte de los esfuerzos en investigación traslacional para los próximos años en FQ.

Para conocer mejor los verdaderos componentes que forman parte de la microbiota fúngica, necesitamos métodos más sensibles como las técnicas

moleculares, que han sido vistas a lo largo de la tesis, capaces de identificar géneros fúngicos no detectables por los cultivos convencionales. Algunos investigadores son conscientes de las limitaciones y los déficits que tienen los medios que se utilizan en la práctica clínica y las ventajas de las técnicas que son empleadas en la investigación, solicitando la colaboración a las organizaciones nacionales de pacientes, así como a las sociedades de fibrosis quística para hacer llegar estos medios a la asistencia diaria.

Otra cuestión relevante que abordar en el futuro es la necesidad de tratamiento de esta colonización. Es bien conocido que el tratamiento con antibioterapia nebulizada de la colonización crónica bacteriana ha demostrado unos efectos positivos en los pacientes con FQ. Existe una gran evidencia científica sobre su eficacia, demostrando la disminución de la densidad bacteriana en las vías aéreas, disminuir el número de exacerbaciones e ingresos hospitalarios, aumentar la función pulmonar, disminuir la mortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes FQ (138). El empleo de antibióticos nebulizados supone un incremento de la concentración del mismo en la zona de infección con un descenso en los efectos adversos sistémicos y minimización de las posibles interacciones farmacológicas (139).

Si estos beneficios se demostraran para la colonización crónica por hongos, estaríamos ante una nueva modalidad de tratamiento que incidiría directamente en las estrategias de tratamiento para la FQ. Como se vio en el apartado anterior son escasos los estudios que se han realizado para investigar este tema. Es importante que se llevaran a cabo ensayos clínicos con mayores tamaños muestrales y que emplearan técnicas moleculares más sensibles capaces de identificar más géneros del reino fúngico obteniendo una información más fiable de la verdadera microbiota que habita en la vía aérea de los pacientes FQ.

Otro tema de futuro para debatir sería la necesidad de tratamiento erradicador en aquellos pacientes con colonización crónica fúngica previa a trasplante pulmonar. La incidencia de las infecciones fúngicas después del trasplante se estima en el 30% (140). Esta complicación es secundaria al uso de inmunosupresión, así como la presencia de deterioro de la depuración mucociliar, lesión isquémica de las vías respiratorias, alteración de la función fagocítica de los macrófagos alveolares y comunicación directa del órgano trasplantado con el medio ambiente(140). La colonización crónica fúngica previa al trasplante pulmonar, y en especial de *Aspergillus*, se ha asociado con una mayor incidencia de infección invasiva y de riesgo de infección de las anastomosis (141). Aunque la profilaxis antifúngica que se realiza tras el trasplante pulmonar han logrado disminuir la incidencia y la mortalidad de las infecciones fúngicas en el trasplante reciente (142), desconocemos si esas incidencias disminuirían más empleáramos estas estrategias previas al trasplante en pacientes con colonización crónica por hongos.

Conclusiones.

PRIMERA. La utilización de técnicas metagenómicas proporciona un mayor rendimiento para el aislamiento de hongos habituales, así como para la detección de hongos no cultivables o desconocidos en los medios de cultivos convencionales.

SEGUNDA. La colonización de hongos en la vía aérea analizada mediante técnicas metagenómicas proporciona información de la prevalencia de la microbiota fúngica en pacientes con FQ.

TERCERA. *Candida* es el hongo más frecuentemente aislado en esputo de los pacientes con FQ por técnica molecular.

CUARTA. No existe un buen grado de acuerdo entre el cultivo de esputo convencional y la técnica molecular empleada.

QUINTA. La frecuencia de aislamiento de hongos por metagenómica es independiente de la colonización crónica o intermitente por *P.aeruginosa* y *S. aureus* en los pacientes con FQ.

SEXTA. En nuestra cohorte el uso de antibióticos vía oral en los 6 meses previos no está relacionado con la presencia de hongos en el esputo analizado con metagenómica.

SÉPTIMA. El tratamiento con corticoides inhalados favorece el aislamiento de hongos identificado mediante metagenómica.

OCTAVA. El aislamiento de hongos mediante metagenómica conlleva un menor valor del FEV₁ (expresado en ml) en los tres periodos de tiempo estudiados, aunque esta relación solo es significativa en la segunda visita.

Anexo I. Información al paciente y consentimiento informado.

JUNTA DE ANDALUCÍA
DE SALUD

CONSEJERÍA



CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE/DONANTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

EVALUACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS METAGENÓMICAS DE LA MICROBIOTA DEL TRACTO RESPIRATORIO DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

La siguiente información describe el estudio a realizar y las consideraciones más importantes sobre las infecciones que frecuentemente afecta a sujetos con fibrosis quística

Importancia:

Uno de los factores que más contribuye al daño pulmonar es la colonización persistente por patógenos bacterianos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Burkholderia cepacia* que se han acoplado al deterioro de la función pulmonar de estos pacientes. Pero, aunque con las bacterias los principales agentes infecciosos en esta enfermedad algunos hongos, incluido *Pneumocystis jirovecii*, pueden colonizar el tracto respiratorio de los pacientes con Fibrosis quística.

El objetivo de este estudio es aportar información sobre los diferentes microorganismos que colonizan el tracto respiratorio de sujetos con FQ, comparándolo con la microbiota presente en los familiares convivientes de la cohorte en estudio y con sujetos controles que presenten las mismas características epidemiológicas y así poder determinar cómo los microorganismos presentes pueden condicionar la evolución de esta enfermedad.

Los procedimientos del estudio consisten en el análisis de la muestra de la muestra (esputo y/o mucosa oral) donde se determinará la presencia de microorganismos. Por tanto, usted no recibirá tratamiento en caso que se detecten microorganismos no patogénicos. Si usted presentara alguna sintomatología o la evolución clínica hiciese sospechar que estos microorganismos le pueden estar causando algún problema de salud usted recibirá tratamiento antibiótico específico frente al mismo, y recibirá todos los cuidados médicos necesarios para el control de su enfermedad.

A todos los participantes en el estudio se les pide su aceptación por escrito.

Implicaciones para el donante/paciente:

La donación/participación es totalmente voluntaria.

El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.

La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la Investigación para el donante/paciente:

Usted (o su hijo) ya se encuentra en seguimiento en esta Unidad de Fibrosis Quística y es revisado de forma periódica. Para realizar nuestro estudio sólo necesitamos una muestra de esputo y/o de la mucosa oral que no pondrá para usted ninguna actuación más de las que habitualmente se le realizan en las revisiones clínicas en esta Unidad.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de la Unidad de Fibrosis Quística o del laboratorio CIBERESP en el teléfono: 955013294 o en el correo electrónico: carmen.horra.exts@juntadeandalucia.es

ANEXO CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE/Donante

< ESTUDIO DE LA MICROBIOTA POTENCIALMENTE PATÓGENA PRESENTE EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS METAGENÓMICAS >

Yo (Nombre y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio < EVALUACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS METAGENÓMICAS DE LA MICROBIOTA DEL TRACTO RESPIRATORIO DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA >
- He recibido suficiente información sobre el estudio < EVALUACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS METAGENÓMICAS DE LA MICROBIOTA DEL TRACTO RESPIRATORIO DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA >
- He hablado con el profesional sanitario informador:
•
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

SI No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado <TÍTULO>

Firma del paciente/ donante
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional
sanitario informador

Nombre y apellidos:.....
Fecha:

Nombre y apellidos:
Fecha:

Anexo II. Cuestionario estandarizado de recogida de datos clínicos.

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

CÓDIGO DEL CASO:

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

	SÍ	NO
Edad menor de 5 años	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Trasplante de órgano	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tratamiento inmunosupresor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Si la respuesta es SÍ en alguna de las preguntas el caso debe de ser excluido del estudio

Nombre:	Espacio para etiqueta de identificación (indicar nombre y número de historia si no se dispone de etiqueta)
Número de Historia Clínica:	

CODIFICACION DEL CASO

1. CÓDIGO DEL CASO ⁽¹⁾	<input type="text" value="___/___"/>	4. GRUPO	Paciente con Fibrosis quística	<input type="checkbox"/>
2. FECHA DE LA VISITA (d/m/a)	<input type="text" value="___/___/___"/>		Conviviente	<input type="checkbox"/>
3. Visita número ⁽²⁾	<input type="text"/>		Grupo control	<input type="checkbox"/>
Persona que incluye el caso	<input type="text"/>		En los convivientes indicar el código del paciente con el que convive	<input type="text"/>

DATOS DEMOGRÁFICOS

5. Iniciales del sujeto (iniciales) ⁽³⁾	<input type="text"/>
6. Sexo (V/M)	<input type="text"/>
7. Fecha de nacimiento (d/m/a)	<input type="text" value="___/___/___"/>
8. Lugar de nacimiento (localidad)	<input type="text"/>
9. Residencia habitual (localidad)	<input type="text"/>

DATOS FÍSICOS

10. Peso (kg)	<input type="text"/>
11. Talla (cm)	<input type="text"/>
12. Índice masa corporal	<input type="text"/>

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

CÓDIGO DEL CASO:

--	--

ANTECEDENTES CLÍNICOS

	SÍ	NO	
13. DIABETES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
15. ALTERACIÓN TOLERANCIA A LA GLUCOSA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
15. ENFERMEDAD HEPÁTICA (transaminasas > 2 rango de normalidad)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
16. INSUFICIENCIA RENAL (creatinina sérica > 2 mg/dl)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
17. INSUFICIENCIA PANCREÁTICA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
18. NEOPLASIA (si la respuesta es SÍ, especificar)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
19. OTROS (si la respuesta es SÍ, especificar)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
20. Aspergilosis broncopulmonar alérgica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
21. Factor de riesgo para infección por VIH	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
22. Tabaquismo (si la respuesta es SÍ, especificar número de paquetes-año) ⁽⁴⁾	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
23. Consumo de alcohol (si la respuesta es SÍ, especificar g/día)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
24. Uso de esteroides en los últimos 6 meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ, especificar : inhalados (IN) / orales (OR) / ambos (AM)			_____
Si la respuesta es SÍ especificar: número de días de tratamiento en los últimos 6 meses			_____
27. Uso de cotrimoxazol en los últimos 6 meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ especificar: número total de días de tratamiento y dosis total de <u>sulfametoxazol</u> en gramos (últimos 6 meses)			Días: ___ Dosis: (g): _____
28. Uso de otros antimicrobianos orales en los últimos 6 meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ, especificar el fármaco			_____
29. Uso de otros antimicrobianos inhalados en los últimos 6 meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ, especificar el fármaco			_____

ESTADO ACTUAL DE SALUD

	SÍ	NO	
30. Fiebre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
31. Presenta el paciente una exacerbación	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ, especificar: leve, moderada, grave			_____
31. Presenta el paciente evidencia microbiológica de infección pulmonar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ, especificar microorganismo			_____

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

CÓDIGO DEL CASO: _ / _

MUESTRAS RECOGIDAS

	SI	NO	No. de muestras	Código de las muestras ⁽⁶⁾
43. Esputo (ES)				
44. Frotis cavidad oral (FCO)				
45. Suero (SU)				
46. Otras (OT), especificar muestra				

DIAGNOSTICO de colonización por PNEUMOCYSTIS

	Pos	Neg	NR
47. Esputo			
47. Suero			
48. Otras			

RESULTADOS DE METAGENÓMICA

	Neg	Pos	Microorganismos
49. Esputo			
50. Frotis cavidad oral			

NOTAS

¹ Usar la clave MetaFQ seguida por un número correlativo para cada caso incluido (01-200 pacientes con FQ, 300-399 convivientes, 500-599 Controles: MetaFQ/01)

² Indicar visita 1, visita 2, visita 3, etc.

³ Una sola inicial para el nombre y dos para los apellidos

⁴ El parámetro recoge intensidad y duración global del hábito. Paquetes-año = Nº cigarrillos fumados al día/20 x años de hábito. Por ejemplo: a) Un paquete al día durante 1 año = 1 paquete-año, b) Dos paquetes durante dos años: 4 paquetes-año

⁵ Rx de tórax, 1 = normal; 2 = infiltrado alveolar; 3 = infiltrado intersticial; 4 = infiltrado mixto; 5 = derrame pleural; 6 = bronquiectasias

⁷ bullas; 8, otros (especificar)

⁶ Código del caso/Revisión (número)/tipo de muestra. Por ejemplo, esputo del paciente 4 en la segunda revisión; Código de la muestra: MetaFQ-4/R2/ES

⁷ Exacerbación de EPOC se define como un empeoramiento sustancial de la enfermedad del paciente respecto a la situación estable, que es agudo en el tiempo y necesita de ajuste de medicación. Leve: incremento de las necesidades de medicación pero el paciente no requiere asistencia médica. Moderado: incremento de las necesidades de medicación que requiere asistencia médica. Grave: requiere hospitalización.

Bibliografia.

1. Quintana-Gallego E, Delgado-Pecellín I, Calero Acuña C. Tratamientos reparadores de la proteína CFTR en la fibrosis quística. Arch Bronconeumol. 2014;50(4):146–50.
2. María R, Moreno G, Salcedo Posadas A, Neumomadrid M. Fibrosis quística. Vol. VIII. 2005. [acceso 5 de septiembre de 2017]. Disponible en www.neumomadrid.org/descargas/monog_neumomadrid_viii.pdf
3. Andersen DH. Cystic Fibrosis of the Pancreas and Its Relation to Celiac Disease. Am J Dis Child. 1938;56(2):344.
4. Farber S, Shwachman H, Maddock CL. Pancreatic function and disease in early life. I. pancreatic enzyme activity and the celiac syndrome. J Clin Invest. 1943;20:827–33.
5. Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome: genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. Am J Dis Child. 1946;72(1):62–80.
6. Di Sant’Agnese PA AD. Celiac Syndrome. IV. Chemotherapy in Infections of the Respiratory Tract Associated with Cystic Fibrosis of the pancreas; Observations with penicillin and drugs of the sulfonamide group, with special reference to penicillin aerosol. Am J Dis Child. 1946;72(1):17.
7. Di Sant’Agnese P a, Darling RC, Perera G a, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. Pediatrics. 1953;12(5):549–63.
8. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics. 1959;23(3):545–549.

9. Corey M, McLaughlin FJ, Williams M, Levison H. A comparison of survival, growth, and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto. *J Clin Epidemiol*. 1988;41(6):583–591.
10. Holby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Relative prevalence of antibodies in serum against cathodic and anodic migrating *P. aeruginosa* antigens determined by immunoelectrophoretic methods. *Acta Pathol Microbiol Scand C*. 1977;85(2):149–52.
11. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1981;305(25):1489–95.
12. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073–1080.
13. Heeley AF, Heeley ME, King DN, Kuzemko JA, Walsh MP. Screening for cystic fibrosis by dried blood spot trypsin assay. *Arch Dis Child*. 1982;57(1):18–21.
14. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med*. 1994;331(10):637–42.
15. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study

- Group. *N Engl J Med*. 1999;340(1):23–30.
16. Castellani C, Macek Jr. M, Cassiman JJ, Duff A, Massie J, ten Kate LP, et al. Benchmarks for cystic fibrosis carrier screening: a European consensus document. *J Cyst Fibros*. 2010;9(3):165–78.
 17. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2012 Annual Data Report. 2012. [acceso el 5 de septiembre de 2017]. Disponible en: www.cysticfibrosisdata.org/LiteratureRetrieve.aspx?ID=149756
 18. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*. 2016;4(8):662–74.
 19. Gartner S, Cobos N. Cribado neonatal para la fibrosis quística. *An Pediatr*. 2009;71(6):481–2.
 20. Quintana-Gallego E, Ruiz-Ramos M, Delgado-Pecellin I, Calero C, Soriano JB, Lopez-Campos JL. Mortality from cystic fibrosis in Europe: 1994-2010. *Pediatr Pulmonol*. 2016;51(2):133–42.
 21. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2015 Annual Data Report. 2015. [acceso el 5 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://www.cff.org/Our-Research/CF-Patient-Registry/2015-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>
 22. Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, et al. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature*. 1985;318(6044):384–385.

23. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, et al. Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. 1990;346(6282):362–5.
24. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*. 1991;66(5):1027–1036.
25. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*. 2016;4(8):662–74.
26. Tratado de Fibrosis Quística. 2012. 551 p.
27. Welsh MJ. Electrolyte transport by airway epithelia. *Physiol Rev* [Internet]. 1987;67(4):1143–84.
28. Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. Vol. 84, *The Medical clinics of North America*. 2000. p. 597–607.
29. Rozmahel R, Wilschanski M, Matin a, Plyte S, Oliver M, Auerbach W, et al. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet*. 1996;12(3):280–287.
30. Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax*. 2007;62(4):360–367.
31. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr*. 2017;181:S4–S15.e1.

32. Rabin HR, Surette MG. The cystic fibrosis airway microbiome. *Curr Opin Pulm Med.* 2012;18(6):622–7.
33. Nguyen LDN, Viscogliosi E, Delhaes L. The lung mycobioime: An emerging field of the human respiratory microbiome. Vol. 6, *Frontiers in Microbiology.* 2015; (6):89.
34. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2014 Annual Data Report 2014. [acceso el 5 de septiembre de 2017]. Disponible en: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Annual_Report_2014_Nov2016.pdf
35. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2013 Annual Data Report. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Data Report. Bethesda (MD). 2013.
36. Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(2):89–104.
37. Montes-Cano MA, De La Horra C, Dapena FJ, Mateos I, Friaiza V, Respaldiza N, et al. Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(10):1008–1011.
38. Cherry, James D; Harrison, Gail J; Kaplan, Sheldon L; Steinbach, William J; Hotez P. Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases. Sexta. 2014.

39. Bargon J, Dauletbaev N, Khler B, Wolf M, Posselt H.G, Wagner TF. Prophylactic antibiotic therapy is associated with an increased prevalence of Aspergihis colonization in adult cystic fibrosis patients. *Respir.* 1999;93(93):835–838.
40. Murray, Patrick R; Rosenthal Ken S; Pfaller MA. *Microbiologia Médica* Ed.Sexta. 2009. 913 p.
41. Boekhout T, Gueidan C, De Hoog S, Samson R, Varga J, Walther G. Fungal Taxonomy: New Developments in Medically Important Fungi. *Curr Fungal Infect Reports Curr Med.* 2009;3:170–178.
42. Varela Aguilar JM, Medrano Ortega FJ, Calderón Sandubete E. *Pneumocystis jirovecii*: un nuevo nombre para un viejo patógeno. *Rev Clínica Española.* 2006;206(6):278–280.
43. Sing A, Geiger AM, Hogardt M, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39(7):2717–2718.
44. Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, et al. Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(12):1012–5.
45. Varela JM, Regordán C, Medrano FJ, Respaldiza N, de la Horra C, Montes-Cano MA, et al. Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(8):770–2.

46. Lacasa EC, Rodríguez JG, Ortega JVG, Mazuelos EM, García JP. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(6):375–379.
47. Gutierrez S, Respaldizan N, Campano E, Martínez-Risquez M.T, Calderón E.J de la H. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. *Parasite*. 2011;1(1):42–48.
48. Solé A. Infección diseminada por *Scedosporium apiospermum* en un receptor de trasplante pulmonar unilateral. *Rev Iberoam*. 2011;28(2):129–133.
49. Blyth C C, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, et al. Detection of Occult *Scedosporium* Species in Respiratory Tract Specimens from Patients with Cystic Fibrosis by Use of Selective Media. *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):314–316.
50. Lackner M, de Hoog GS, Yang L, Ferreira Moreno L, Ahmed SA, Andreas F, et al. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Divers*. 2014;67(1):1–10.
51. Bittar F, Richet H, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Stremmler N, Sarles J, et al. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2008;3(8):e2908.
52. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(1):193–213.

53. Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The Airway Microbiota in Cystic Fibrosis: A Complex Fungal and Bacterial Community—Implications for Therapeutic Management. Brown SP, editor. *PLoS One*. 2012;7(4):e36313.
54. White TJ, Bruns T, Lee S TJ. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. 1990. 315–322.
55. Vendrell M, de Gracia J, Oliveira C, Ángel Martínez M, Girón R, Máiz L, et al. Diagnóstico y tratamiento de las bronquiectasias. *Arch Bronconeumol*. 2008;44(11):629–640.
56. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. Vol. 26, *European Respiratory Journal*. 2005. 319–338.
57. López de Ullibarri Galparsoro I, Pita Fernández S. Medidas de concordancia : el índice de Kappa. *Cad Aten Primaria*. 1999;6:169–171.
58. Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, et al. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. 2014;2:1–15.
59. Losada PM, Chouvarine P, Schulz A, Hedtfeld S, Mielke S, Dorda M, et al. The microbial metagenome of cystic fibrosis lower airways. *J Cyst Fibros*. 2015;14:S66.
60. Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, et al. Microbiome Diversity in the Bronchial Tracts of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

61. Nevez G, Robert-Gangneux F, Pougnet L, Virmaux M, Belleguic C, Deneuille E, et al. *Pneumocystis jirovecii* and Cystic Fibrosis in Brittany, France. *Mycopathologia*. 2017 Jul 07.
62. Horré R, Symoens F, Delhaes L, Bouchara J-P. Fungal respiratory infections in cystic fibrosis: a growing problem. *Med Mycol*. 2010;48 Suppl 1:S1–3.
63. Huffnagle GB, Noverr MC. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol*. 2013;21(7):334–341.
64. Pashley CH, Fairs A, Free RC, Wardlaw AJ. DNA analysis of outdoor air reveals a high degree of fungal diversity, temporal variability, and genera not seen by spore morphology. *Fungal Biol*. 2012;116(2):214–24.
65. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The Effect of Chronic Infection With *Aspergillus fumigatus* on Lung Function and Hospitalization in Patients With Cystic Fibrosis. *Chest*. 2010;137(1):171–176.
66. Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV1 decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest*. 2010;138(5):1186–1195.
67. Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, et al. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome*. 2014;2(1):40.
68. Charlson ES, Diamond JM, Bittinger K, Fitzgerald AS, Yadav A, Haas AR, et al. Lung-enriched Organisms and Aberrant Bacterial and Fungal Respiratory Microbiota after Lung Transplant. *Am J Respir Crit Care Med*.

2012;186(6):536–45.

69. Harrison MJ, Twomey KB, McCarthy Y, O'Connell OJ, Alston M, Febrer M, et al. WS8.1 The role of second-generation sequencing in describing the fungal microbiota in the adult cystic fibrosis (CF) airway and its correlation with clinical phenotype. *J Cyst Fibros*. 2013;12:S16.
70. Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Walker JM, Goldsmith CE, Rendall J, et al. Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2010;48(1):166–176.e1.
71. Hauser PM, Bernard T, Greub G, Jaton K, Pagni M HG. Microbiota Present in Cystic Fibrosis Lungs as Revealed by Whole Genome Sequencing. *PLoS One*. 2014;9(3):1–7.
72. Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, Guzman CA, Abraham WR, Höfle MG. Cohort study of airway mycobiome in adult cystic fibrosis patients: Differences in community structure between fungi and bacteria reveal predominance of transient fungal elements. *J Clin Microbiol*. 2015;53(9):2900–7.
73. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *PLoS Pathog*. 2010;6(1).
74. Noni M, Katelari A, Kaditis A, Theochari I, Lympari I, Alexandrou-Athanassoulis H, et al. *Candida albicans* chronic colonisation in cystic fibrosis may be associated with inhaled antibiotics. *Mycoses*. 2015;58(7):416–21.

75. Chotirmall SH, Greene CM, McElvaney NG. *Candida* species in cystic fibrosis: A road less travelled. *Med Mycol.* 2010;48 Suppl 1(O1):S114–124.
76. Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Müller F-MC. Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Med Mycol.* 2010;48(1):56–63.
77. Sawyer SM, Bowes G, Phelan PD. Vulvovaginal candidiasis in young women with cystic fibrosis. *BMJ.* 1994;308(6944).
78. Helmi M, Love RB, Welter D, Cornwell RD, Meyer KC. *Aspergillus* Infection in Lung Transplant Recipients With Cystic Fibrosis* Risk Factors and Outcomes Comparison to Other Types of Transplant Recipients. *Chest.* 2003 Mar;123(3):800-8.
79. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2008;7(2):123–7.
80. Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nubling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. Häufigkeit von *Aspergillus fumigatus* und anderen Pilzen im Sputum von erwachsenen Mukoviszidose-Patienten. *Mycoses.* 2003;46(1–2):19–23.
81. Güngör Ö, Tamay Z, Güler N, Erturan Z. Frequency of fungi in respiratory samples from Turkish cystic fibrosis patients. *Mycoses.* 2013;56(2):123–9.
82. Cimon B, Zouhair R, Symoens F, Carrère J, Chabasse D, Bouchara J-P. *Aspergillus terreus* in a cystic fibrosis clinic: environmental distribution and patient colonization pattern. *J Hosp Infect.* 2003;53(1):81–2.

83. Bouchara J-P, Sanchez M, Esnault K, Tronchin G. Interactions between *Aspergillus fumigatus* and Host Matrix Proteins. *ContribMicrobiol.* 1999;2:167-81
84. Cimon B, Carrere J, Chazalette JP, Ginies JL, Six P, Vinatier JF, Chabassed D, Bouchara JP. Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. *Journal de mycologie médicale.* 1995 (5): 211-216
85. Chotirmall SH, McElvaney NG. Fungi in the cystic fibrosis lung: Bystanders or pathogens? *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;52:161–73.
86. Máiz L, Cuevas M, Lamas A, Sousa A, Quirce S, Suárez L. *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in cystic fibrosis: clinical significance and specific immune response involving serum immunoglobulins G, A, and M. *Arch Bronconeumol.* 2008;44(3):146–51.
87. Sudfeld CR, Dasenbrook EC, Merz WG, Carroll KC, Boyle MP. Prevalence and risk factors for recovery of filamentous fungi in individuals with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2009;9:110–6.
88. Milla CE, Wielinski CL, Regelman WE. Clinical significance of the recovery of *Aspergillus* species from the respiratory secretions of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* 1996;21(1):6–10.
89. Jubin V, Ranque S, Stremier Le bel N, Sarles J, Dubus J-C. Risk Factors for *Aspergillus* Colonization and Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Children With Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45(8):764–71.
90. Chotirmall SH, Al-Alawi M, Mirkovic B, Lavelle G, Logan PM, Greene CM, et al. *Aspergillus*-associated airway disease, inflammation, and the innate immune response. *Biomed Res Int.* 2013;2013:723129.

91. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis a review. *Med Mycol.* 2009;47(4):387–97.
92. Bauernfeind A, Bertele RM, Harms K, Hörl G, Jungwirth R, Petermüller C, et al. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection.* 1987;15(4):270–7.
93. Nelson LA, Callerame ML, Schwartz RH. Aspergillosis and atopy in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1979;120(4):863–73.
94. Cimon B, Carrere J, Chazalotte JP, Ginies JL, Chabasse D, Bouchara JP. Bronchopulmonary mycoses in cystic fibrosis: results of a five-year longitudinal study. *Journal de Mycologie Médicale.* 2000; (10):128-135.
95. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and Clinical Significance of *Pneumocystis* Colonization. *J Infect Dis.* 2008;197(1):10–7.
96. Calderón EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet.* 1996;347(9006):977.
97. Medrano FJ, Respaldiza N, Medrano A, Varela JM, Montes-Cano M, de la Horra C, et al. Seroprevalence of *Pneumocystis* human infection in southern Spain. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50:649–650.
98. Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, et al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(11):1029–1031.

99. Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, Morilla R, de La Horra C, Montes-Cano MA, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol.* 2012;50(5):556–560.
100. Guarro J, Serda Kantarcioglu A, Horr  R, Rodriguez-Tudela JL, Estrella MC, Berenguer J, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. 2006; 44:295-327
101. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(1):53–56.
102. Williamson ECM, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJJ. Molecular Epidemiology of *Scedosporium apiospermum* Infection Determined by PCR Amplification of Ribosomal Intergenic Spacer Sequences in Patients with Chronic Lung Disease. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):47–50.
103. Astrid M, Cornelia L-F, Manfred DP, Johannes R. Abundance of *Pseudallescheria boydii* in cystic fibrosis (CF)- Patients revealed by a semi-selective isolation method. 2017. Disponible en: http://www.p-e-g.org/sac/fruehjahrstagung07/Mayr_poster.pdf
104. Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, W rstl B, et al. Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. *J Cyst Fibros.* 2015;14(2):237–41.

105. Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Guého E. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses*. 2009;37(3–4):71–8.
106. Sidot C, Simon P, Bouchara JP, Chabasse D, Urban T, Giniès JL. *Scedosporium apiospermum*. Environmental study in the homes of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2007;6:S29.
107. Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):766–771.
108. García E, Rodríguez V, Gartner S, Gené J. Isolation of *Scedosporium prolificans* in patients with cystic fibrosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*;16(10):488–9.
109. Solé M, Cano J, Rodríguez-Tudela JL, Pontón J, Sutton DA, Perrie R, et al. Molecular typing of clinical and environmental isolates of *Scedosporium prolificans* by inter-simple-sequence-repeat polymerase chain reaction. *Med Mycol*. 2003;41(4):293–300.
110. Delhaes L, Harun A, Chen SCA, Nguyen Q, Slavin M, Heath CH, et al. Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(2):282–290.

111. Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Goldsmith CE, Rendall J, Moore JE. Development of a novel PCR assay for the identification of the black yeast, *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* from adult patients with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros*. 2008;7:576–80.
112. Mounier J, Gouëlle A, Keravec M, Le Gal S, Pacini G, Debaets S, et al. Use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) to characterize the bacterial and fungal airway microbiota of cystic fibrosis patients. *J Microbiol*. 2014;52(4):307–14.
113. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Human Skin Fungal Diversity. *Nature*. 2013; 498(7454): 367–370.
114. Jagielski T, Rup E, Ziółkowska A, Roeske K, Macura AB, Bielecki J. Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatol*. 2014;14:1–15.
115. Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(3):454-500.
116. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, et al. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Med Mycol*. 2010;48 Suppl 1(O1):88-97.
117. Shafaghi S, Pour Abdollah M, Tabarsi P, Ghorbani F, Makki SSM, Khoddami Vishteh HR, et al. Concomitant cryptococcosis and burkholderia infection in an asymptomatic lung transplant patient with cystic fibrosis. *Int J organ Transplant Med*. 2010;1(4):183–6.

118. Cimon B, Carrere J, Chazalotte JP, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP. Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol.* 1999;37:291–3.
119. Maiz L, Cuevas M, Quirce S, Can JF, Pacheco A, Sousa A, et al. Serologic IgE immune responses against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis. *Chest.* 2002;121(3):782–8.
120. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest.* 2010;137(1):171–6.
121. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SC-A. Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol.* 2010 ;48(O1):37–44.
122. de Vrankrijker AMM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJL, Bonten MJM, et al. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(9):1381–6.
123. Fillaux J, Brémont F, Murriss M, Cassaing S, Rittié J-L, Tétu L, et al. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand J Infect Dis.* 2012; 44(11):842–7.
124. Noni M, Katelari A, Dimopoulos G, Doudounakis S-E, Tzoumaka-Bakoula C, Spoulou V. *Aspergillus fumigatus* chronic colonization and lung function decline in cystic fibrosis may have a two-way relationship. *Eur J Clin*

Microbiol Infect Dis. 2015;34(11):2235-2241.

125. Saunders R V., Modha DE, Claydon A, Gaillard EA. Chronic *Aspergillus fumigatus* colonization of the pediatric cystic fibrosis airway is common and may be associated with a more rapid decline in lung function. *Med Mycol.* 2016;54(5):537-543.
126. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis-State of the Art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis.* 2003;(37 suppl 3):225–264.
127. Aaron SD, Vandemheen KL, Freitag A, Pedder L, Cameron W, Lavoie A, et al. Treatment of *Aspergillus fumigatus* in Patients with Cystic Fibrosis: A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. Aggarwal AN, editor. *PLoS One.* 2012;7(4):e36077.
128. Coughlan CA, Chotirmall SH, Renwick J, Hassan T, Low TB, Bergsson G, et al. The Effect of *Aspergillus fumigatus* Infection on Vitamin D Receptor Expression in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(10):999–1007.
129. Chishimba L, Niven RM, Cooley J, Denning DW. Voriconazole and Posaconazole Improve Asthma Severity in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and Severe Asthma with Fungal Sensitization. *J Asthma.* 2012;49(4):423–433.
130. Holle J, Leichsenring M, Meissner PE. Nebulized voriconazole in infections with *Scedosporium apiospermum* - Case report and review of the literature. *J Cyst Fibros.* 2014;13(4):400–402.

131. Hilberg O, Bendstrup E, Mortensen J, Andersen C. Inhaled Voriconazole - An Efficient Treatment Against Invasive Aspergillosis. In: D63 Advances in treatment of respiratory infections. American Thoracic Society; 2012.. p. A6088–A6088.
132. Troke P, Aguirrebengoa K, Arteaga C, Ellis D, Heath CH, Lutsar I, et al. Treatment of Scedosporiosis with Voriconazole: Clinical Experience with 107 Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1743–1750.
133. Rondeau S, Couderc L, Dominique S, Pramil S, Leguillon C, Masseline B, et al. High frequency of voriconazole-related phototoxicity in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J.* 2012;39(3):782–784.
134. Burgel P-R, Baixench M-T, Amsellem M, Audureau E, Chapron J, Kanaan R, et al. High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):869–74.
135. Morio F, Aubin GG, Danner-Boucher I, Haloun A, Sacchetto E, Garcia-Hermoso D, et al. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(8):1870-3.
136. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, et al. *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2243–2251.

137. Gammelsrud KW, Sandven P, Høiby EA, Sandvik L, Brandtzaeg P, Gaustad P. Colonization by *Candida* in children with cancer, children with cystic fibrosis, and healthy controls. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):1875–1881.
138. Inhaled medication and inhalation devices for lung disease in patients with cystic fibrosis: A European consensus. *J CystFibros*. 2009 Sep;8(5):295-315.
139. Martínez-García MÁ. Tratamiento antibiótico nebulizado. *Arch Bronconeumol*. 2014;50(10):415–416.
140. Solé A, Salavert M. Fungal infections after lung transplantation. *Transplant Rev*. 2008;22(2):89–104.
141. Gavalda J, Len O, San Juan R, Aguado JM, Fortun J, Lumbreras C, et al. Risk Factors for Invasive Aspergillosis in Solid-Organ Transplant Recipients: A Case-Control Study. *Clin Infect Dis*. 2005;41(1):52–59.
142. Magill SS, Dropulic LK. Antifungal prophylaxis in transplant recipients: where do we go from here? *Transpl Infect Dis*. 2006;8(4):187–189.