

VALORACIÓN DE LA POSIBLE TRANSMISIÓN INTRAFAMILIAR DE BACTERIAS QUE COLONIZAN A LOS PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

E. Quintana-Gallego^{1,2}, L. Carrasco Hernández^{1,2}, I. Delgado Pecellín³, C. Calero Acuña^{1,2}, E. Calderón Sandubete⁴, C. de la Horra Padilla⁵.

¹Unidad Médico- Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla. ²CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Instituto de Salud Carlos III, Madrid. ³Servicio de Pediatría, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla. ⁴Servicio de Medicina Interna, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla. ⁵Instituto de Biomedicina de Sevilla. IBIS.

Proyecto financiado con Beca Fundación Neumour 12/2009

Resumen

Introducción: En la Fibrosis Quística (FQ), la patología broncopulmonar es la más representativa y grave en todo el espectro de la enfermedad, causada principalmente por la colonización persistente de la vía aérea por bacterias con capacidad patogénica. Su control es fundamental para mejorar el pronóstico de estos pacientes. Conocer las fuentes de infección en estos casos permitiría diseñar mejores estrategias para su prevención.

Objetivos: Evaluar, en el entorno familiar de pacientes con FQ, la posible transmisión de bacterias que frecuentemente colonizan las vías respiratorias, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*.

Material y método: Se incluyeron un total de 10 pacientes con FQ y 15 familiares convivientes, de los que se tomaron muestras de esputo y frotis orofaríngeo respectivamente. En ellos se trataron de identificar bacterias mediante técnicas de metagenómica (PCR- DGGE del gen 16S-rRNA para bacterias) y de ampliación de ácidos nucleicos.

Resultados: Los resultados del estudio de metagenómica mostraron la presencia de diferentes bacterias en todos los pacientes evaluados, siendo las más frecuentes *Pseudomonas spp.* (n=9), *Streptococcus spp.* (n=4), *Staphylococcus spp.* (n=2) y *Haemophilus influenzae* (n=2). En los familiares se identificó por PCR *Pseudomonas aeruginosa* en el 46,5% de los casos y *S. pneumoniae* en el 66,7%. La concordancia entre familiares y pacientes fue del 40% para *P. aeruginosa*, con coincidencia de genotipos del 100% y una concordancia del 20% para *S. pneumoniae*.

Conclusiones: La presencia de bacterias que frecuentemente colonizan el tracto respiratorio de los pacientes con fibrosis quística es frecuente entre los familiares que cohabitan con ellos, lo que podría facilitar la transmisión de unos sujetos a otros y la persistencia de éstas en el entorno familiar.

Palabras clave: Fibrosis Quística, transmisión, infección cruzada.

ASSESSMENT OF POSSIBLE INTRA-FAMILY TRANSMISSION OF BACTERIA THAT COLONIZE PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

Abstract

Introduction: In Cystic Fibrosis (CF), bronchial-pulmonary pathology is the most representative and serious within the scope of this disease, and generally caused by the persistent colonization of the airways by pathogenic bacteria. Control is essential to improve the prognosis of these patients. In these cases, understanding the source of infection would facilitate the design of improved prevention strategies.

Objectives: Assess, within the family environment of patients with CF, the possible transmission of bacteria that frequently colonize airways, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae*.

Material and methods: Ten patients with CF were included in this study, as well as 15 cohabiting relatives, from whom sputum samples and oropharyngeal smears were taken respectively. Using metagenomics, the bacteria were identified (PCR- DGGE of the gene 16S-rRNA for bacteria) and the expanding of nucleic acids.

Results: The results of the metagenomic study proved the presence of various bacteria in all patients assessed, with the most frequent being *Pseudomonas spp.* (n=9), *Streptococcus spp.* (n=4), *Staphylococcus spp.* (n=2) and *Haemophilus influenzae* (n=2). Using PCR in the relatives, *P. aeruginosa* was identified in 46.5% of the cases, and *S. pneumoniae* in 66.7%. Consistency between relative and patient was 40% for *P. aeruginosa*, with a 100% genotype coincidence and a 20% consistency for *S. pneumoniae*.

Conclusions: The presence of bacteria that frequently colonize the respiratory tract in patients with cystic fibrosis is recurrent among relatives cohabiting with them, which could facilitate the transmission of bacteria from one person to another and the persistence of said bacteria within the family environment.

Key words: Cystic Fibrosis, transmission, cross-infection.

Recibido: 15 de octubre de 2015. Aceptado: 22 de septiembre de 2016.

Esther Quintana-Gallego
maria.e.quintana.sspa@juntadeandalucia.es

INTRODUCCIÓN

La FQ es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente de la raza caucásica, causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína RTFQ (regulador de la conductancia transmembrana de la FQ) y tiene como consecuencia la alteración en el transporte de iones, fundamentalmente de cloro, en las células epiteliales. Esto conlleva a una producción de secreciones anormalmente espesas y viscosas en los diferentes órganos afectados¹, provocando el deterioro de la función pulmonar, infecciones de repetición (pulmonares y de vías respiratorias altas), mala absorción por insuficiencia pancreática exocrina, pérdida de sal en el sudor, afectación hepatobiliar obstructiva e infertilidad masculina, entre otras manifestaciones clínicas.

En el aparato respiratorio, estas secreciones espesas y deshidratadas alteran el aclaramiento mucociliar en la superficie de las células epiteliales² y, como consecuencia, predisponen a la colonización bronquial por microorganismos potencialmente patógenos que incrementan la inflamación. De esta manera, la utilización de antiinflamatorios y antibióticos en los pacientes con FQ ha contribuido decisivamente a mejorar la calidad de vida y el pronóstico vital, alcanzando hoy día los 40 años^{3,4}, al romper el círculo vicioso de la inflamación-infección bronquial crónica. Pese a ello, más del 95% de los pacientes fallecen de complicaciones respiratorias.

La colonización de la vía aérea tiene una secuencia temporal bien definida, asociada, entre otros factores, a la edad de los pacientes⁵. Durante los primeros años de vida, cobran especial importancia las infecciones virales. Tras este periodo inicial, la colonización más frecuente es por *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* y, a medida que avanza la edad, aumenta el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) hasta convertirse en el patógeno más prevalente en la edad adulta⁶. Con el deterioro de la función pulmonar, la edad y la presión antibiótica, aparecen hongos y otros bacilos gram negativos no fermentadores.

Si bien las vías respiratorias de los pacientes con FQ son propicias para el crecimiento de *P. aeruginosa*, existe un claro beneficio en supervivencia en aquellos casos que se mantienen libres de esta colonización⁷. Por este motivo, se han desarrollado estrategias de vigilancia y erradicación de este patógeno con antibioterapia oral y nebulizada⁸ que han permitido disminuir la prevalencia de la infección crónica, mejorar la salud de los pacientes y su función pulmonar, así como la disminución de costes⁹.

Conocer todas las fuentes de infección y los mecanismos de transmisión de los diferentes patógenos respiratorios que colonizan a los pacientes con FQ permitiría diseñar mejores estrategias de prevención. En general, se desconoce la fuente de adquisición de *P. aeruginosa*. Existe un reservorio ambiental, especialmente en lugares húmedos y calientes^{10,11}, pero también hay evidencias de infecciones cruzadas entre pacientes en campamentos, reuniones, consultas y hospitalización¹². Sin embargo, no se ha estudiado la posibilidad de la transmisión de *P. aeruginosa* u otras bacterias a través del contacto cercano entre los pacientes y su familia.

En los últimos años, hemos asistido a una revolución en la identificación rápida y sencilla de patógenos por técnicas moleculares. Esto nos ha permitido complementar las técnicas microbiológicas clásicas, para el estudio cualitativo y cuantitativo de los diferentes nichos ecológicos, incluidos aquellos que presentan microbiota residente habitual y la identificación de microorganismos de difícil crecimiento en los cultivos clásicos. De todas las nuevas herramientas moleculares, la metagenómica, basada en la secuenciación masiva de todos los fragmentos de ADN de una muestra, es la que parece tener mayor proyección¹³.

En el presente estudio, se plantea la utilización combinada de técnicas de metagenómica y de amplificación de ácidos nucleicos, muy sensibles para la detección específica de algunos patógenos, para evaluar, de forma preliminar, la posible transmisión de bacterias en el entorno familiar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal de sujetos con FQ, atendidos en una revisión rutinaria en la Unidad de FQ de referencia de Andalucía Occidental. Los criterios de inclusión fueron:

- 1) Edad mayor de 10 años.
- 2) Diagnóstico confirmado de FQ (clínica compatible con 2 test de sudor positivos o un estudio genético confirmando las dos mutaciones del gen de la proteína RTFQ).
- 3) Posibilidad de obtener una muestra respiratoria de esputo convencional.
- 4) Encontrarse estable y libre de exacerbación aguda.
- 5) Firma del consentimiento informado por parte del paciente, padres o tutor legal en caso de menores de edad, previa explicación del estudio.

Se excluyeron a los pacientes con tratamientos inmunosupresores y/o trasplantes de órganos. De la misma forma, se invitaron a participar en el estudio a todos los familiares que acudieron acompañando a los pacientes a la revisión clínica y que compartían vivienda con los casos índice, pudiendo o no dormir en la misma habitación.

Los datos epidemiológicos, clínicos y microbiológicos de los pacientes se recogieron mediante un formulario estructurado, en donde se incluyeron todas las variables del estudio. Para asegurar la confidencialidad de la información, la identificación de los pacientes y muestras procesadas en el laboratorio se enmascararon bajo unos códigos.

De cada caso índice con FQ se tomaron dos muestras de esputo en condiciones de asepsia, para evitar contaminantes. Se dividieron en alícuotas de 500 µL, enviándose una muestra al Servicio de Microbiología y la otra al laboratorio de investigación, donde se mantuvo criopreservada a -20°C hasta su procesamiento. De los familiares participantes en el estudio se tomó una muestra de frotis orofaríngeo mediante kit e-Swab® específico para bacterias, quedando almacenada en una nevera con hielo hasta su recepción en el laboratorio. Una vez allí, cada muestra se dividió en dos alícuotas y se mantuvieron almacenadas a -20°C hasta su posterior procesamiento.

El aislamiento de ADN de muestras biológicas se realizó mediante modificación del protocolo que se emplea en el Kit comercial de Machenary-Nage®, puesto a punto en nuestro laboratorio para muestras de esputo. Para estudiar la composición cualitativa de cada muestra se empleó la técnica de PCR-DGGE, con cebadores de bacteria universales: F-968 y R-1378. Los diferentes alelos se visualizaron en geles de poliacrilamida, mediante la técnica de DGGE. Para la DGGE, el ADN amplificado se ajustó a una cantidad de 200 ng, que se añadió en cada carril para proceder a la electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturalizante 18 - 38%. La electroforesis se realizó en buffer 1X Tris-Acetato-EDTA a 60°C, a un voltaje constante de 180 V durante 18 h. El revelado se realizó mediante tinción de bromuro de etidio y se escaneó para su posterior análisis de imagen. Con objeto de obtener un material más limpio, tras desteñir las bandas el ADN, se sometió a PCR específica. Cada una de las bandas se recortó, re-amplificó y secuenció para identificar a la bacteria correspondiente. Una vez finalizados todos los experimentos de DGGE, se analizaron la similitud de todos los patrones de bandas obtenidos me-

dante un software informático (Phoretix 5.0®), que se basa en el índice de similitud de Dice. Todos los microorganismos identificados se incluyeron en las siguientes reacciones para establecer un patrón. En aquellos casos en los que el número de microorganismos presentes fuera pequeño y en cualquier caso para corroborar todos los datos obtenidos mediante PCR-DGGE, se planteó la secuenciación metagenómica de toda la muestra.

Para evitar falsos positivos debido a contaminación, 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 y/o ADN control.

En este estudio se aplicaron los principios éticos recogidos en la última revisión de la declaración de Helsinki y el proyecto fue aprobado, antes de su realización, por el Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de diez pacientes, atendidos de forma consecutiva que, cumpliendo los criterios de inclusión, aceptaron voluntariamente participar en el estudio. De ellos, ocho (80%) eran mujeres y dos eran hombres, con una edad media de $19,7 \pm 7,42$ años (rango 13 - 30). Aceptaron participar en el estudio 15 familiares convivientes, ocho hombres y siete mujeres, todos ellos con un periodo de contacto con el caso índice mayor o igual a seis horas al día.

En la tabla 1 se muestran las características clínico-epidemiológicas más importantes de los pacientes.

Identificación de bacterias en pacientes con FQ: en la tabla 2 queda reflejado los resultados de la metagenómica, la PCR y el cultivo convencional.

Los resultados del estudio de metagenómica mostraron la presencia de diferentes bacterias en todos los pacientes evaluados, siendo las más frecuentemente identificadas *Pseudomonas* (nueve pacientes), *Streptococcus* (cuatro pacientes), *Staphylococcus* (dos pacientes) y *Haemophilus influenzae* (dos pacientes). Por otro lado, en el cultivo convencional de bacterias fue positivo para *P. aeruginosa* en el 60% de los casos, mientras que por técnicas

moleculares el microorganismo se identificó en el 90% de los sujetos. El cultivo fue negativo para *S. pneumoniae* en todos los pacientes y positivo por PCR en dos.

Identificación de bacterias en los familiares convivientes: en la tabla 3 quedan recogidos los resultados de las muestras del frotis orofaríngeo de los convivientes. El análisis mediante PCR mostró la presencia de *P. aeruginosa* en el 46,7% de los sujetos y *S. pneumoniae* en el 66,7%.

Concordancia de los resultados entre pacientes con fibrosis quística y convivientes: la concordancia entre pacientes y convivientes se refleja en la tabla 4.

Los resultados de la PCR para *P. aeruginosa* fueron concordantes entre pacientes y familiares (paciente+ / familiar+, o paciente- / familiar-) en el 40% de los casos y discrepantes (paciente+ / familiar- o paciente- / familiar+) en el restante 60%. Para *S. pneumoniae*, la concordancia fue del 5/15 - 31%. La concordancia entre los genotipos de *P. aeruginosa* observados en los pacientes con FQ y sus familiares convivientes fue del 100%.

Tabla 1. Características clínicas y epidemiológicas de los afectados de fibrosis quística

Sexo	8 mujeres, 2 hombres
Edad (años), media ± desviación estándar	19,7 ± 7,42
IMC (Kg/m ²), media ± desviación estándar	17,73 ± 3,03
FEV ₁ , media ± desviación estándar	60,77 ± 20,87
Diabetes Mellitus	10%
Intolerancia oral a la glucosa	60%
Insuficiencia pancreática exocrina	60%
Corticoides inhalados	50%
Colonización crónica por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60%
Antibioterapia en los seis meses previos*	90%

IMC: índice de masa corporal.
FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

Tabla 2. Identificación de microorganismos por distintos métodos en los pacientes con fibrosis quística

Código	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>		Bacterias
	PCR	Cultivo	PCR	Cultivo	Metagenómica (PCR 16S-DGGE)
FQ-1	+	+	-	-	2 Uncultured bacterium sp., <i>P. aeruginosa</i>
FQ-2	+	-	-	-	<i>Streptococcus 3 sp</i> , <i>Erysipelotrichaceae spp</i> , <i>Fusobacterium spp</i> , <i>P. aeruginosa</i>
FQ-3	+	-	-	-	Uncultured bacterium, <i>Streptococcus 3 sp</i>
FQ-4	+	+	-	-	Uncultured bacterium, <i>Staphylococcus spp</i> , <i>P. aeruginosa</i>
FQ-5	+	+	+	-	Uncultured bacterium sp, <i>Pseudomonas spp</i>
FQ-6	+	+	-	-	<i>Neisseria spp</i> , <i>Prevotella spp</i> , <i>P. sixantha</i>
FQ-7	+	+	-	-	Uncultured bacterium sp, <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Actinomyces spp</i> , <i>P. aeruginosa</i>
FQ-8	+	-	-	-	2 uncultured bacterium sp, <i>Streptococcus spp</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
FQ-9	-	+	+	-	<i>H. influenzae</i> , <i>Staphylococcus spp</i>
FQ-10	+	-	-	-	Uncultured bacterium, <i>B. cepacia</i> , <i>Pseudomonas sp</i>

Tabla 3. Microorganismos identificados en los familiares convivientes

Conviviente (Código)	Caso índice (código)	Parentesco	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
C-301	FQ-1	Madre	-	+
C-302	FQ-2	Marido	+	-
C-303	FQ-3	Madre	+	+
C-304	FQ-4	Padre	-	+
C-305	FQ-4	Marido	-	+
C-306	FQ-5	Madre	+	+
C-307	FQ-6	Padre	+	-
C-308	FQ-7	Padre	-	+
C-309	FQ-7	Madre	-	+
C-310	FQ-8	Madre	+	+
C-311	FQ-8	Tía	-	-
C-312	FQ-8	Padre	+	+
C-313	FQ-9	Madre	+	-
C-314	FQ-10	Marido	-	-
C-315	FQ-1	Padre	-	+

Tabla 4. Concordancia de los resultados de PCR entre pacientes y familiares convivientes

Paciente	Familiar	Pseudomonas aeruginosa		Streptococcus pneumoniae	
		FQ	Familiar	FQ	Familiar
FQ-1	C-301 (Madre)	+	-	-	+
	C-315 (Padre)		-		+
FQ-2	C-302 (Marido)	+	+	-	-
FQ-3	C-303 (Madre)	+	+	-	-
FQ-4	C-304 (Padre)	+	-	-	+
	C-305 (Marido)		-		+
FQ-5	C-306 (Madre)	+	+	+	+
FQ-6	C-307 (Padre)	+	+	-	-
FQ-7	C-308 (Padre)	+	-	-	+
	C-309 (Madre)		-		+
FQ-8	C-310 (Madre)	+	+	-	+
	C-311 (Tía)		-		-
	C-312 (Padre)		+		+
FQ-9	C-313 (Madre)	-	+	+	-
FQ-10	C-314 (Marido)	+	-	-	-

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se analiza por primera vez la posible transmisión intrafamiliar de bacterias en pacientes con FQ mediante técnicas de metagenómica. Sus resultados han permitido comprobar que la presencia de bacterias que normalmente colonizan el tracto respiratorio de estos pacientes, como *P. aeruginosa*, son también identificadas en los familiares convivientes, sugiriendo fuertemente la posible transmisión en el entorno familiar.

P. aeruginosa es el microorganismo que más frecuentemente coloniza a los pacientes adultos con FQ⁸. En nuestro estudio, se identifica en el 90 % de los pacientes y en el 46,7 % de los familiares convivientes. Su transmisión suele ocurrir por contacto directo, gotas y fómites. *P. aeruginosa* no mucoide sobrevive 24 h en superficies inertes y la mucoide de 48 h hasta 8 días en el esputo sobre una superficie seca. Son factores de riesgo para la aparición precoz de *P. aeruginosa*: el sexo femenino, la mutación Delta F508 en homocigosis y los

aislamientos previos de *S. aureus*¹⁰. Se ha descrito la infección cruzada entre pacientes en campamentos de enfermos¹⁴ y también en centros de FQ¹⁵, aunque hasta la fecha no se había evaluado la posible transmisión hacia familiares convivientes que no padecen la enfermedad. Esta es una de las conclusiones que podrían deducirse de los resultados del presente estudio, dada la concordancia del genotipado de *P. aeruginosa* entre ambos. Esto puede tener gran relevancia clínica, porque se podría perpetuar el nicho ecológico en el entorno familiar, dado que las estrategias de tratamiento tras el aislamiento del patógeno están enfocadas exclusivamente en el paciente. En la última revisión de las guías para el control y la prevención de la infección cruzada, se insiste en que hay que proporcionar a las familias las recomendaciones para evitar la misma y que se las involucre en la resolución de problemas y el desarrollo de herramientas educativas¹².

S. pneumoniae es menos frecuente en la fibrosis quística que *P. aeruginosa* o *S. aureus*. Probablemente se deba, entre otros motivos, a que estos pacientes constituyen un grupo de alto riesgo de enfermedad invasiva por el patógeno y son regularmente vacunados¹⁶. *S. pneumoniae* forma parte de la flora habitual de la rinofaringe en humanos y se transmite de persona a persona por secreciones de la vía respiratoria tras un contacto estrecho y prolongado¹⁷. La transmisión intrafamiliar del *S. pneumoniae* se ha demostrado, no sólo entre hermanos, sino entre niños y adultos. Las cepas que colonizan a los ancianos son similares a las de los niños que conviven con ellos¹⁷. En personas sanas menores de 65 años no está indicada la vacunación para el neumococo. Este hecho podría justificar la escasa identificación en pacientes (2 / 10) y su alta prevalencia en convivientes (10 / 15).

La limitación más importante es el pequeño tamaño muestral, lo que impide garantizar que el resultado sea representativo del global de la población de pacientes y de sus familiares convivientes. Sin embargo, esta limitación es común en los estudios de metagenómica, en donde la complejidad de la técnica hace que en los análisis publicados se incluyan siempre un número limitado de casos. Por otra parte, en lo que respecta a la evaluación de la transmisión intrafamiliar, se trata de un estudio piloto donde, por motivos de eficiencia, es frecuente la inclusión de un bajo número de sujetos.

CONCLUSIONES

La presencia de bacterias que frecuentemente colonizan el tracto respira-

torio de los pacientes con FQ es frecuente entre los familiares que cohabitan con ellos. La transmisibilidad de los microorganismos entre pacientes y cohabitantes parece ser intermedia para *P. aeruginosa* y baja para *S. pneumoniae*. La colonización entre cohabitantes podría facilitar la transmisión de unos sujetos a otros y la persistencia de estos microorganismos en el entorno familiar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boyle MP. Adult cystic fibrosis. JAMA 2007; 298: 1787-1793.
2. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. N Engl J Med 2005; 352: 1992-2001.
3. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry. Annual Data Report 2012. Bethesda, Maryland.
4. McIntyre K. Gender and survival in cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med 2013; 19: 692-697.
5. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. Lancet 2009; 373: 1891-1904.
6. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M et al. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2011; 24: 29-70.
7. Pressler T. Targeting airway inflammation in cystic fibrosis in children: past, present, and future. Paediatr Drugs 2011; 13: 141-147.
8. Cantón R, Máiz L, Escribano A et al. Spanish consensus on the prevention and treatment of Pseudomonas aeruginosa bronchial infections in cystic fibrosis patients. Arch Bronconeumol 2015; 51: 140-50.
9. Davidson AG, Chilvers MA, Lillquist YP. Effects of a Pseudomonas aeruginosa eradication policy in a cystic fibrosis clinic. Curr Opin Pulm Med 2012; 18: 615-621.
10. Maselli J, Sontag M, Norris J et al. Risk factors for initial acquisition of Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. Pediatr Pulmonol 2003; 35: 257-62.
11. Goeminne PC, Nawrot TS, De Boeck K et al. Proximity to blue spaces and risk of infection with Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: A case-control analysis. J Cyst Fibros. 2015; 14: 741-7.
12. Saiman L, Siegel JD, LiPuma JJ et al. Infection, prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. Infect Control Hosp Epidemiol 2014; 35(Suppl 1): S1-67.
13. Tamames J, Moya A. Estimating the extent of horizontal gene transfer in metagenomic sequences. BMC Genomics 2008; 9: 136.
14. Ojienyi B, Frederiksen B, Høiby N. Pseudomonas aeruginosa cross-infection among patients with cystic fibrosis during a winter camp. Pediatr Pulmonol 2000; 29: 177-181.
15. Jones A, Govan J, Doherty C et al. Spread of a multiresistant strain of Pseudomonas aeruginosa in an adult cystic fibrosis clinic. Lancet 2001; 358: 557-58.
16. Picazo JJ, González-Romo F, García-Rojas A et al. Consensus document on pneumococcal vaccination in adults with risk underlying clinical conditions. Rev Esp Quimioter 2013; 26: 232-52.
17. Comité Asesor de Vacunas. Asociación Española de Pediatría. [Online]; 2012 cited 2014. Available from: <http://vacunas.aep.org/printpdf/profesionales/enfermedades/neumococo>