

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina Clínica

Universidad Miguel Hernández



**Estudio de la microbiota de vías respiratorias
en pacientes pediátricos con fibrosis quística
mediante secuenciación masiva y su relación
con distintas variables clínicas**

TESIS DOCTORAL

Antonia Sánchez Bautista

San Juan (Alicante), 2017



Universidad Miguel Hernández

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina Clínica

Programa de Doctorado: Medicina Clínica

**Estudio de la microbiota de vías respiratorias en
pacientes pediátricos con fibrosis quística
mediante secuenciación masiva y su relación
con distintas variables clínicas**

Tesis Doctoral presentada por

Antonia Sánchez Bautista

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz,

Dr. Joaquín Portilla Sogorb y Dr. Pedro Jesús Alcalá Minagorre

Febrero 2017

D. JAVIER FERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Director del Departamento
de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo **“Estudio de la microbiota de vías respiratorias en pacientes pediátricos con fibrosis quística mediante secuenciación masiva y su relación con distintas variables clínicas”** presentado por Dña. Antonia Sánchez Bautista bajo la dirección del Dr. D. Juan Carlos Rodríguez Díaz, del Dr. D. Joaquín Portilla Sogorb y del Dr. D. Pedro Jesús Alcalá Minagorre.

Lo que firmo en San Juan de Alicante a Veinte de Febrero de Dos Mil Diecisiete.

Firma: Prof. Javier Fernández Sánchez
Director del Departamento de Medicina Clínica
de la Universidad Miguel Hernández.



Dr. D. Juan Carlos Rodríguez Díaz, Dr. D. Joaquín Portilla Sogorb, y
Dr. D. Pedro Jesús Alcalá Minagorre, como Directores de la Tesis
Doctoral

CERTIFICAN:

Que el trabajo **“Estudio de la microbiota de vías respiratorias en pacientes pediátricos con fibrosis quística mediante secuenciación masiva y su relación con distintas variables clínicas”**, realizado por Dña. Antonia Sánchez Bautista ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmamos para los oportunos efectos en San Juan de Alicante a Veinte de Febrero de Dos Mil Diecisiete.

Fdo. Dr. D. Juan Carlos Rodríguez Díaz
Director Tesis Doctoral

Fdo. Dr. D. Joaquín Portilla Sogorb
Director Tesis Doctoral

Fdo. Dr. D. Pedro Jesús Alcalá Minagorre
Director Tesis Doctoral



DEDICATORIAS

A Pedro Alcalá por querer que seamos una sola gota.

A mi familia que es el motor que me mueve.

AGRADECIMIENTOS

- . Al Dr. Juan Carlos Rodríguez por su aportación material y personal sin las cuales no hubiera sido posible la realización de esta tesis.
- . Al Dr. Chimo Portilla por ser uno de los pilares de nuestro Hospital y a la vez tan cercano.
- . A la Dra. Gloria García y a la Dra. Carmen Luna, por su imprescindible colaboración.
- . A Antonio Galiana por ayudarme, aún cuando no tenía tiempo.
- . A Inma y Noemí por la ayuda molecular prestada.
- . A Encarni, de la Biblioteca del H.G.U. de Alicante, por su magnífica disposición y profesionalidad.
- . Al Dr. Pepe Sánchez por estar siempre ahí, ser mi referente laboral y mi amigo.
- . A todos los padres de niños con fibrosis quística que a pesar de las dificultades ofrecen su ayuda para el avance en el conocimiento de esta enfermedad.

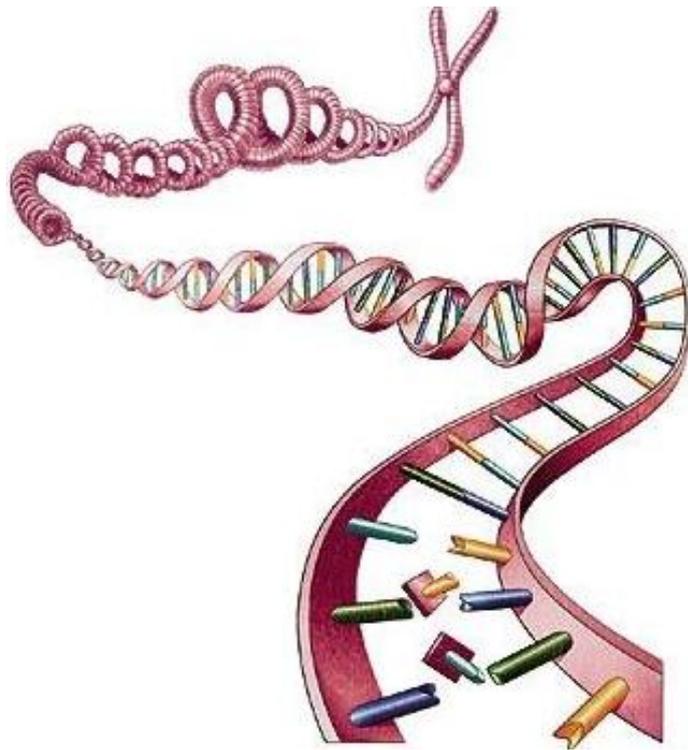
Dedicado a todos los niños con fibrosis quística

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con la ayuda de la **Fundación Navarro Trípodi**. 2015

ANEXO VI





ÍNDICE

ÍNDICE

SIGLAS Y ACRÓNIMOS	I
I. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA	1
1.1 Definición y magnitud del Problema	3
1.1.1 Fibrosis quística. Epidemiología y fisiopatología	3
1.1.2 Importancia de la enfermedad pulmonar	4
1.1.3 Cronoinfección pulmonar en la fibrosis quística . Principales microorganismos implicados en la colonización/infección	4
1.1.4 Microorganismos clásicamente implicados en la colonización/infección broncopulmonar crónica	6
1.1.4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.1.4.1.a Frecuencia	
1.1.4.1.b Impacto sobre el curso clínico de la enfermedad	
1.1.4.1.c Adaptación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> durante la infección pulmonar crónica en fibrosis quística	
1.1.4.1.d <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Desarrollo de mecanismos de resistencia antibiótica	
1.1.4.1.e Evaluación microbiológica de la colonización-infección pulmonar por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
1.1.4.1.f Patrones microbiológicos de la colonización-infección pulmonar por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
1.1.4.1.g Interacción de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con otras especies, con la flora del huésped y con otros patógenos. Comunicación interespecies	
1.1.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.1.4.2.a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilin resistente	
1.1.4.3 <i>Haemophilus influenzae</i>	17
1.1.4.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
1.1.4.5 Otros microorganismos	18
1.1.4.5.a <i>Burkholderia cepacia</i> complex	
1.1.4.5.b <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
1.1.4.5.c <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	
1.1.4.5.d Enterobacterias	
1.1.4.5.e Micobacterias no tuberculosas	
1.1.4.5.f Hongos levaduriformes y <i>Aspergillus spp</i>	
1.1.4.5.g <i>Pneumocystis jirovecii</i>	
1.1.4.5.h Virus respiratorios y otras bacterias	
1.1.5. Estrategias de estudio de infección y terapia antibiótica	25
1.1.5.1 Estudios microbiológicos clásicos. Limitaciones	26

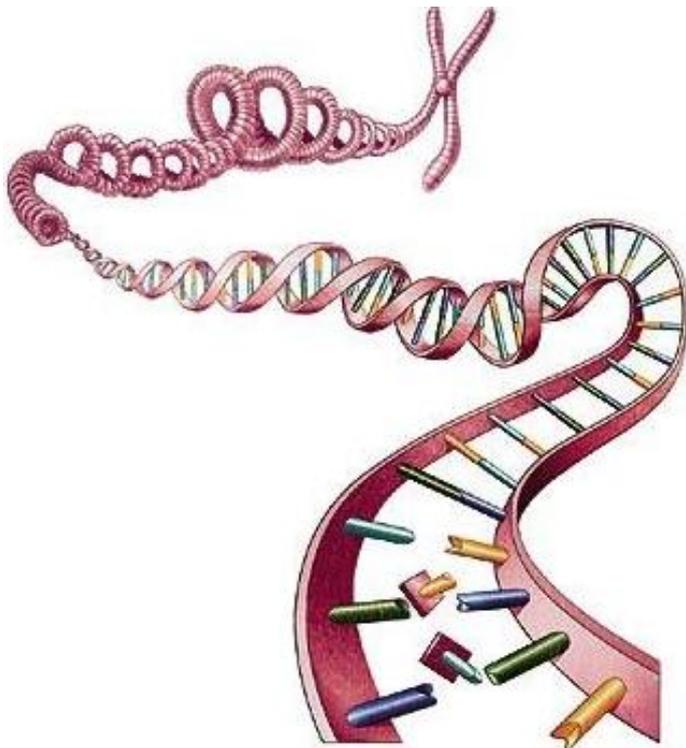
<u>1.2 Estudio del microbioma de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística</u>	27
1.2.1 Microbioma y otros conceptos	27
1.2.1.1 Identificación bacteriana mediante secuenciación del gen ARNr 16 S	28
1.2.1.2 Análisis de la comunidad microbiana	29
1.2.2 Equipos de secuenciación	32
1.2.2.1 Illumina	33
1.2.3 Microbioma en las vías respiratorias en estado de salud y enfermedad	35
1.2.4 Microbioma en pacientes con fibrosis quística	37
1.2.4.1 Diferencias en la composición del microbioma entre pacientes con fibrosis quística y pacientes sanos	37
1.2.4.2 Composición del microbioma en pacientes con fibrosis quística	37
1.2.4.3 Variación interindividual y núcleo del microbioma	39
1.2.4.4 Cambios evolutivos en la composición del microbioma en pacientes con fibrosis quística	40
1.2.4.4.a Diferencias en la composición del microbioma en las distintas localizaciones de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística	
1.2.4.4.b Evolución del microbioma de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística desde la edad pediátrica a edad adulta	
1.2.4.4.c Composición del microbioma en función del estado de enfermedad pulmonar	
1.2.4.4.d Impacto sobre el microbioma de la infección/colonización por patógenos clásicos	
1.2.4.4.e Interacción entre especies	
1.2.4.4.f Relación con mutación del CFTR	
1.2.4.4.g Hermanos, gemelos homocigóticos, familiares y convivientes	
1.2.4.4.h Exacerbaciones respiratorias	
1.2.4.4.i Relación con tratamientos antimicrobianos	
1.2.4.5 Contribución del DNA de bacterias no viables en los estudios de secuenciación masiva	48
1.2.5 Posibles aplicaciones en la práctica clínica del estudio del microbioma en pacientes con fibrosis quística	49
1.2.5.1 Aplicaciones diagnósticas	49
1.2.5.2 Aplicaciones terapéuticas	50
1.2.6 Limitaciones de las técnicas basadas en biología molecular	51
1.2.7 Limitaciones ocasionadas la validez de las muestras obtenidas por esputo	52
1.2.8 Aspectos indeterminados, incertidumbres sobre el microbioma y enfermedad pulmonar en fibrosis quística	52
II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	55
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	59

3.1 Hipótesis	61
3.1.1 Hipótesis conceptual	61
3.1.2 Hipótesis operativa	61
3.2 Objetivos	61
3.2.1 Objetivo general	61
3.2.2 Objetivos específicos	62
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	63
4.1 Diseño del estudio	65
4.2 Aspectos éticos	65
4.3 Población y ámbito de estudio	65
4.3.1 Población a estudio	65
4.3.2 Criterios de inclusión y exclusión	66
4.4 Centros de trabajo y competencias	66
4.5 Clasificación de variables	67
4.5.1 Variables explicativas	67
4.5.1.1 Intrínsecas al huésped	67
4.5.1.2 Relacionadas con la enfermedad	67
4.5.1.3 Resultados microbiológicos previos (sobre muestras respiratorias)	68
4.5.1.4 Aspectos terapéuticos	70
4.5.2 Captación y recogida de datos	70
4.5.3 Cuestionario para la recogida de variables explicativas	71
4.5.4 Variables resultado: Microbiota de las vías respiratorias de los pacientes	71
4.5.4.1 Composición del microbioma	71
4.5.4.2 Análisis de la diversidad de especies bacterianas	72
4.5.4.2.a Alfa Diversidad	
4.5.4.2.b Beta Diversidad	
4.6 Recogida y Procesamiento de Muestras	74
4.6.1 Extracción y purificación del DNA bacteriano	74
4.6.2 Amplificación del DNA bacteriano	74
4.6.3 Secuenciación masiva y filtrado por calidad de secuenciación	77
4.6.4 Ensamblaje de genes bacterianos y obtención de secuencias 16S	77
4.6.4 Análisis de datos de secuenciación. Bioinformática	78
4.6.5 Conservación posterior de muestras	79

4.7	Análisis Estadístico	79
4.8	Procedimiento Estadístico	79
4.8.1	<i>Estadística descriptiva</i>	79
4.8.2	<i>Análisis univariante</i>	80
V.	RESULTADOS	81
5.1	Variables Explicativas	83
5.1.1	<i>Características demográficas de los pacientes</i>	83
5.1.2	<i>Características relacionadas con la fibrosis quística y la evolución de la enfermedad</i>	83
5.1.3	<i>Aspectos terapéuticos</i>	88
5.2	Aspectos relativos a la muestra	89
5.3	Análisis molecular de la composición de la microbiota presente en las muestras de esputo de los pacientes	89
5.3.1	<i>Descripción del microbioma, composición de géneros, número, frecuencias, árbol filogenético y heat map</i>	90
5.3.1.1	Géneros y distribución por las muestras	90
5.3.1.2	Abundancia relativa, géneros dominantes, núcleo del microbioma	93
5.3.1.3	Presencia de patógenos clásicos en las secuencias	96
5.3.2	<i>Análisis de la diversidad alfa y beta de las comunidades bacterianas estudiadas</i>	96
5.3.2.1	Alfa Diversidad	96
5.3.2.2	Beta Diversidad	97
5.3.2.3	Principales características de los grupos de componentes principales. Relación con el número de géneros y la diversidad alfa	98
5.3.3	<i>Análisis comparativo de las comunidades bacterianas en función de las variables clínicas</i>	101
5.3.3.1	Heat map del análisis filogenético y las variantes clínicas	101
5.3.3.2	Bondad de Ajuste	103
5.3.3.3	Análisis estadístico entre las distintas variables clínicas y la riqueza de especies y diversidad del microbioma	103
5.3.3.3.a	Edad de los pacientes	
5.3.3.3.b	Género de los pacientes	
5.3.3.3.c	Genotipo mutación CFTR	
5.3.3.3.d	Afectación nutricional	
5.3.3.3.e	Comorbilidad respiratoria no relacionada con fibrosis quística	
5.3.3.3.f	Afectación respiratoria determinada por el valor teórico de FEV1	
5.3.3.3.g	Antecedente de exacerbaciones respiratorias	
5.3.3.3.h	Antecedentes de colonización por patógenos clásicos	
5.3.3.3.i	Aspectos terapéuticos de los pacientes	
5.3.3.3.j	Estudio estratificado de variables de confusión	

VI. DISCUSIÓN	117
<u>6.1 Sentido del estudio</u>	119
<u>6.2 Características de la población estudiada</u>	120
<u>6.3 Aspectos metodológicos</u>	121
6.3.1 ¿Es el esputo una muestra válida para el estudio del microbioma de las vías respiratorias inferiores?	121
6.3.2 Técnica	122
6.3.3 Bacterias vivas o muertas, ¿relevante?	122
<u>6.4 Composición del microbioma en niños con fibrosis quística y su relación con las variables clínicas</u>	123
6.4.1 Composición del microbioma, similitud con otros estudios y microbioma de población sana	123
6.4.2 Número de géneros que integran el microbioma y diversidad, y relación con grupos de análisis de componentes principales	124
6.4.3 Relación del microbioma con la enfermedad pulmonar y edad de los pacientes	124
6.4.4 Exacerbaciones	125
6.4.5 Otras variables clínicas	126
6.4.5.1 Genotipo y otras variables	126
6.4.5.2 Tratamiento antibiótico	127
6.4.5.3 Antecedentes de infección por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	128
<u>6.5 Relaciones entre las comunidades que integran el microbioma en la fibrosis quística</u>	129
6.5.1 Disbiosis	130
6.5.2 La presencia de bacterias inesperadas puede explicar la inflamación y deterioro pulmonar sin la presencia de patógenos considerados clásicos	130
6.5.3 Relación entre patógenos: <i>Staphylococcus aureus</i> meticilin sensible y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	131
6.5.4 Papel de los gérmenes anaerobios integrantes en el microbioma	132
<u>6.6 Aplicación de la metagenómica en la asistencia de pacientes con fibrosis quística</u>	133
6.6.1 Estudio del microbioma para determinar la evolución de la enfermedad y la respuesta a intervenciones	133
6.6.2 Herramientas terapéuticas	136
6.6.2.1 Antibioterapia dirigida	136
6.6.2.2 Modificación del microbioma	137
6.6.2.3 Disminución de las resistencias bacterianas	138
<u>6.7 Limitaciones del estudio</u>	138
6.7.1 Por el diseño de investigación y el tipo de estudio elegido	138
6.7.2 Por el número de pacientes	139

6.7.3	<i>Por el tipo de muestra elegida</i>	140
6.7.4	<i>Por la técnica empleada</i>	140
6.7.5	<i>Por no haber realizado cultivo paralelo ni técnicas específicas moleculares para determinar Pseudomonas aeruginosa</i>	141
6.8 Futuras preguntas de investigación		141
6.8.1	<i>Sobre la evolución dinámica de las comunidades bacterianas de las vías respiratorias a largo plazo</i>	141
6.8.2	<i>Sobre la evolución dinámica dinámica de las comunidades bacterianas de las vías respiratorias a corto plazo</i>	142
6.8.3	<i>Sobre el papel que juegan los anaerobios en las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística</i>	142
VII. CONCLUSIONES		143
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		147
IX. ANEXOS		169
	.ANEXO I . Aprobación del comité ético de investigación clínica del Hospital 12 de Octubre	171
	.ANEXO II . Formulario de encuesta	173
	.ANEXO III . Listado de recogida de muestras	175
	.ANEXO IV . Consentimiento informado	177
	.ANEXO V . Biobanco	179
	.ANEXO VI . Fuentes de Financiación	183
	.ANEXO VII . Comunicaciones en congresos	185



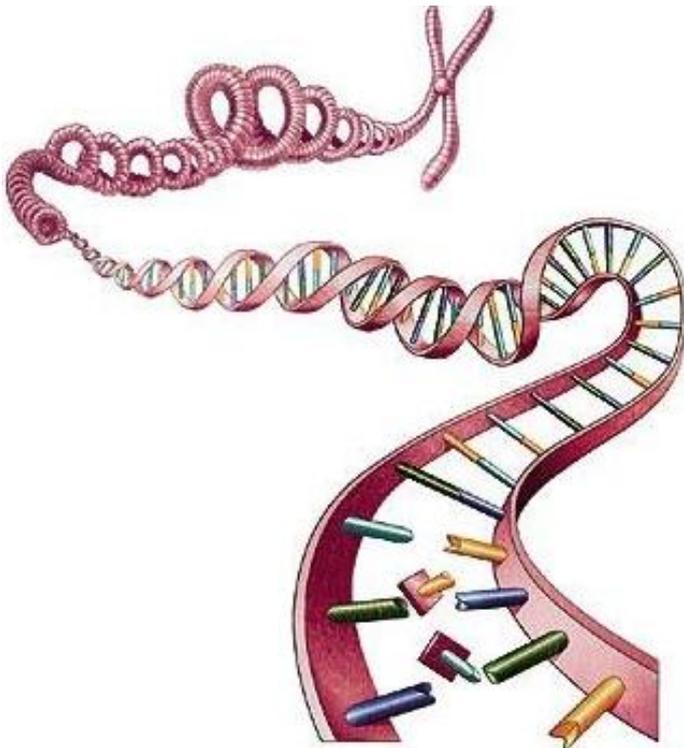
SIGLAS Y ACRÓNIMOS



SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ΔF508:	Mutación por delección de la fenilalanina en la posición 508 del CFTR
BAL:	Lavado broncoalveolar
CBC:	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
CFTR:	Regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
FEV1:	Fracción en el primer segundo de la espiración forzada
FQ:	Fibrosis quística
MNT:	Micobacterias no tuberculosas
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
QS:	Quorum sensing
SAMR:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SAMS:	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
OTU:	Unidad taxonómica operativa
MDA:	Amplificación por desplazamiento múltiple
ACP:	Análisis de componentes principales





ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA



1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1.1 Definición y magnitud del problema

1.1.1 Fibrosis quística. Epidemiología y Fisiopatología

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética, de herencia autonómica recesiva, ampliamente distribuida por todo el mundo. Se estima que 1 de cada 25 individuos de raza caucásica es portador heterocigoto sano, y en nuestro medio se estima una incidencia de la enfermedad de 1 por cada 4500 recién nacidos vivos (1).

La enfermedad está causada por mutaciones del gen que codifican el CFTR (siglas en inglés del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística). Hasta el momento se han identificado unas 1600 mutaciones (2), que por diversos mecanismos moleculares desencadenan la misma consecuencia: una limitación en el transporte de cloro a través de las membranas de células epiteliales exocrinas, con modificación de las secreciones en los órganos afectados. No obstante cada mutación confiere unas características fenotípicas predominantes, lo que puede justificar en parte las diferencias en las manifestaciones clínicas entre pacientes con FQ (3).

Clásicamente se ha considerado que la FQ es un trastorno genético que da lugar a una enfermedad grave en los primeros años de vida, y que cuyas manifestaciones más comunes son la malabsorción intestinal, la malnutrición y la neumopatía crónica. Pero actualmente es considerada como un trastorno complejo, con un amplio espectro de expresiones clínicas que pueden acontecer en cualquier edad (4).

1.1.2. Importancia de la enfermedad pulmonar

Tras la introducción de la terapia con enzimas pancreáticas y las mejoras de tratamiento nutricional (5), las complicaciones más importantes que condicionan el pronóstico de los pacientes se relacionan con la infección bacteriana broncopulmonar crónica y la inflamación concomitante (6,7). Pese a los avances en las medidas terapéuticas, el 90% de la mortalidad en pacientes con FQ se relaciona con las consecuencias de la enfermedad pulmonar (8).

Pese a que a nivel colectivo la progresión de la enfermedad pulmonar es frecuentemente predecible e inexorable, existe una importante variabilidad entre individuos, con pacientes sanos por encima de los 30 años y niños en la segunda década de vida abocados al trasplante pulmonar (9).

1.1.3. Cronoinfección pulmonar en la fibrosis quística. Principales microorganismos implicados en la colonización/infección

La colonización e infección del árbol bronquial en el paciente con FQ es consecuencia de una serie de procesos multifactoriales relacionados con la alteración del gen CFTR (10). Las modificaciones del CFTR producen una alteración en la composición cualitativa de las secreciones respiratorias, con una mayor viscosidad de las mismas, disminución de la capacidad de aclaramiento y transporte ciliar de patógenos (11). Otros factores que propician la colonización e infección son las condiciones de anaerobiosis y microaerofilia, producidas por las secreciones espesas y los mecanismos inflamatorios en las vías respiratorias (12), y la formación de receptores celulares específicos para *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias (13). No obstante en el momento actual, no se conocen todos los factores que favorecen la propensión de los pacientes con FQ a sufrir infecciones por los gérmenes considerados clásicamente patógenos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*) (14).

Existe un modelo clásico de infección progresiva que tiende a la cronificación en un pulmón enfermo, sobre el que se sustenta la terapia respiratoria en la FQ. Tradicionalmente sólo unos organismos concretos se han asociado a infecciones crónicas en FQ, con una progresión desde la edad temprana hasta la adulta. La frecuencia y la especie de los microorganismos aislados en el tracto respiratorio de los pacientes con FQ varía con la progresión de la enfermedad (15). En los primeros años de la vida, las infecciones virales podrían generar un estado crónico de inflamación que puede evidenciarse incluso antes de aislarse los patógenos clásicos en estos pacientes (6). Con los medios tradicionales de diagnóstico microbiológico basados en cultivo, es frecuente en la primera década de vida el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, aunque son rápidamente relegados a un segundo plano y sustituidos por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, que se estima que colonizan a más de $\frac{3}{4}$ partes de los pacientes adultos con FQ. *Pseudomonas aeruginosa* es considerado como el patógeno más determinante del curso de la enfermedad. Su aislamiento se asocia a un deterioro progresivo e irreversible de la función pulmonar, lo que determina su relevancia por encima del resto de los patógenos (16).

Debido en parte a la mejora en la expectativa de vida, a lo largo de la evolución microbiológica pulmonar de los pacientes con FQ se incrementa el aislamiento de otros bacilos gramnegativos no fermentadores, entre los que destacan *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter spp.* y especies del complejo *Burkholderia cepacia* 6. La mayoría de éstos son intrínsecamente resistentes a muchos antibióticos, y en algunos casos son de difícil cultivo por los medios convencionales.

Existen determinantes no infecciosos, genéticos y ambientales modificadores de la enfermedad que contribuyen a la progresión del daño pulmonar (17): el estado nutricional, la diabetes relacionada con la FQ y la insuficiencia pancreática (18). Además se han encontrado diferencias en la forma que los agentes patógenos individuales influyen en distintos grupos de población, tanto con FQ como sin esta enfermedad (19) (Figura 1).

Asimismo, no siempre está claro si un patógeno es verdaderamente emergente, o si el aumento de la prevalencia está relacionada con las técnicas mejoradas de detección y una mayor vigilancia (14).

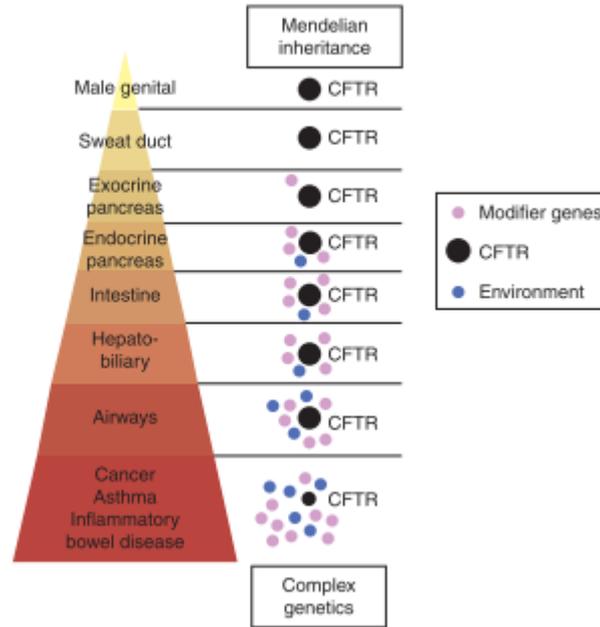


Figura 1: Esquema de la magnitud del efecto de la mutación CFTR, de la influencia ambiental y los genes modificadores. [Tomado de Knowles MR et al (19)]

1.1.4. Microorganismos clásicamente implicados en la colonización/infección broncopulmonar crónica

1.1.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

La relevancia que este patógeno Gram-negativo tiene en la FQ se basa en su alta prevalencia de colonización y en su relación con el deterioro pulmonar progresivo de los pacientes con FQ (20).

1.1.4.1.a Frecuencia

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa que coloniza las vías respiratorias de la mayoría de pacientes que presentan FQ en edad adulta. Se consideraba que se producía un incremento progresivo de la tasa de colonización, pasando de menos

de un tercio de colonizados a más de un 80% en edad adulta. Sin embargo, nuevos estudios han demostrado que en un número importante de pacientes con FQ la colonización por *P. aeruginosa* se produce antes de los 3 años de vida (8,20), generalmente a partir de microorganismos presentes en el medio ambiente. En estudios realizados en lactantes diagnosticados mediante cribado neonatal de FQ se ha demostrado que *P. aeruginosa* puede aislarse ya en una fase temprana de la enfermedad (21), incluidos lactantes con ausencia clínica de enfermedad pulmonar. Esto sugiere que el patógeno ya está presente en las vías respiratorias de los lactantes con FQ, en una fase anterior a que se haga evidente a través del cultivo tradicional del esputo o cultivo orofaríngeo (14,22). Entre los factores que se han descrito favorecedores a la adquisición temprana de *P. aeruginosa* se encuentran el sexo femenino, homocigosis para la mutación deleción F508 ($\Delta F508$), y el contacto con niños mayores con FQ ya colonizados (22).

El análisis genético ha mostrado que la mayoría de las cepas que inicialmente colonizan las vías respiratorias son únicas y proceden de reservorios ambientales. No obstante se ha descrito la transmisión cruzada entre pacientes en un misma familia, reuniones de enfermos y brotes epidémicos en centros sanitarios (23). Además, a lo largo de la enfermedad es posible la reinfeksió con cepas con el mismo o distinto genotipo (24). El origen de la reinfeksió puede ser además de fuentes ambientales, la presencia de un reservorio no detectado en el paciente, como los senos paranasales (25).

1.1.4.1.b Impacto sobre el curso clínico de la enfermedad

La colonización-infección por *Pseudomonas aeruginosa* se relaciona claramente con una mayor morbilidad y mortalidad en el paciente con FQ. Se ha evidenciado un progresivo deterioro de la función pulmonar, una menor supervivencia y una adquisición en edades tempranas que influye negativamente en el pronóstico de la enfermedad (16). En comparación con pacientes de similares características no colonizados, la infección por *P. aeruginosa* se ha asociado con empeoramiento clínico y radiológico. Se ha documentado que la probabilidad de fallecer en niños de 8-13 años es tres veces mayor si están colonizados por *P. aeruginosa* a los 5 años (23).

La presencia continuada de *P. aeruginosa* incrementa la inflamación de respuesta inmunitaria, mediada en su mayoría por neutrófilos, con un incremento del número de proteasas, participación de linfocitos T, macrófagos, interleucinas y otros mediadores proinflamatorios (26) (Figura 2). Estos factores combinados con el daño activo causado por la bacteria incrementan la obstrucción bronquial y la destrucción pulmonar (27).

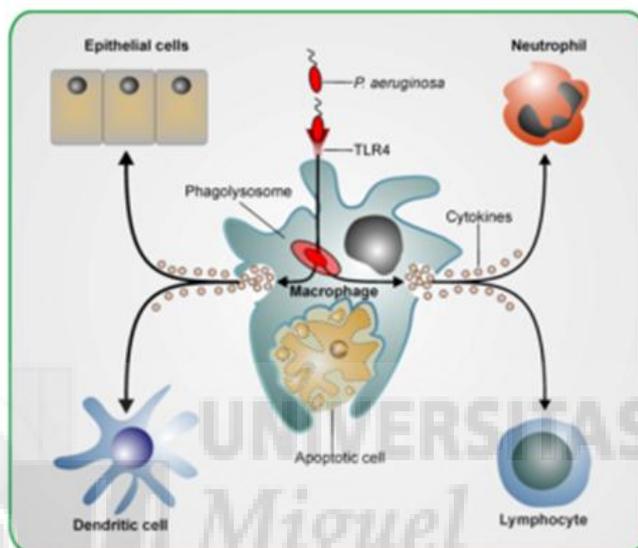


Figura 2: Esquema de la respuesta inflamatoria en el epitelio de las vías respiratorias de pacientes con FQ tras la infección/colonización de *Pseudomonas aeruginosa*. [Tomado de Hartl D et al (26)]

1.1.4.1.c Adaptación de *Pseudomonas aeruginosa* durante la infección pulmonar crónica en fibrosis quística

Los fenotipos de *Pseudomonas aeruginosa* aislados en pacientes con FQ y en aquellos con enfermedad pulmonar crónica avanzada difieren sustancialmente de los que han iniciado la colonización en fases precoces de la enfermedad (28). La transición de fenotipos ambientales a fenotipos pulmonares altamente adaptados y especializados tiene lugar mediante un proceso de adaptación y selección de mutaciones que favorece su supervivencia y crecimiento en las vías respiratorias de los pacientes con FQ (29).

Inicialmente, la colonización del tracto respiratorio se produce por fenotipos no mucoides, generalmente sensibles a los antimicrobianos y se suele presentar con una baja densidad bacteriana (23). Posteriormente y durante un período variable, el aislamiento de la bacteria en las muestras respiratorias puede ser intermitente. Sólo en estos períodos iniciales de la colonización parece posible la erradicación de este microorganismo mediante terapia antibiótica (30).

A lo largo de la vida del paciente con FQ suele persistir un único genotipo, aun en los casos en los que se produce una falsa erradicación bajo tratamiento con pautas efectivas de antimicrobianos (27,28). A pesar de ello, se produce una diversificación en los diferentes compartimientos pulmonares, con aparición de múltiples morfotipos, *auxotrofías* (proliferación del germen sólo si existe una sustancia en medio de cultivo que en condiciones normales no está presente) y con perfiles diferenciados de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos. A medida que progresa la colonización, *P. aeruginosa*, a través de un intenso proceso de adaptación genética (31), realiza una serie de modificaciones, de la que emergen gran cantidad de variantes fenotípicas que favorecen su supervivencia en el pulmón del paciente con FQ. Fruto de esta adaptación, muchas cepas generan biopelículas con gran cantidad de alginato (32), un exopolisacárido que rodea las bacterias, y las protege de los cambios externos, con lo que se dificulta el proceso de fagocitosis, el aclaramiento ciliar y el tratamiento antibiótico. Además este biofilm genera un efecto profundamente proinflamatorio, lo que repercute negativamente en la función pulmonar. En el pulmón de un paciente con FQ, *P. aeruginosa* puede inactivar la producción de moléculas altamente inmunogénicas para evitar ser detectadas por el sistema inmunitario, y además puede producirse el desarrollo de variantes de lento crecimiento. En estas condiciones, se produce una selección de clones específicos muy adaptados al entorno, que conlleva la colonización permanente del pulmón y una erradicación habitualmente inviable (33).

Muchos aspectos evolutivos de la enfermedad y su tratamiento, como la destrucción de las vías respiratorias, la respuesta inmunitaria, el tratamiento antibiótico previo, la competencia entre especies, la hipoxia, la formación de biopelículas, la carencia y suplemento de nutrientes, favorecen la adquisición de mecanismos de adaptación de *P.*

aeruginosa (28). Una de las propiedades que caracteriza el desarrollo de *P. aeruginosa* en el pulmón del paciente con FQ es la hipermutabilidad (34), a diferencia de lo que acontece en las infecciones agudas y en las formas ambientales de *P. aeruginosa* (35). Estas adaptaciones metabólicas de la bacteria parecen jugar un papel clave en la supervivencia del germen en el pulmón con FQ y posiblemente, siguen mecanismos similares otras infecciones crónicas.

1.1.4.1.d *Pseudomonas aeruginosa*. Desarrollo de mecanismos de resistencia antibiótica

Dado que la aparición de *Pseudomonas aeruginosa* se ha relacionado con el deterioro de la función pulmonar, el tratamiento antibiótico dirigido contra este microorganismo es un pilar de todos los regímenes terapéuticos de los pacientes con FQ. Para ello se han utilizado antibióticos sistémicos e inhalados buscando su eliminación. Sin embargo, una característica que define a *P. aeruginosa* en la FQ es su capacidad de desarrollar resistencias a los antimicrobianos lo que, unido al limitado número de antibióticos disponibles, dificulta el tratamiento de muchos pacientes.

La infección crónica por *P. aeruginosa* se precede de una fase de colonización intermitente, considerada una ventana de oportunidad terapéutica. En esta fase, una terapia antibiótica agresiva puede retrasar el estado de infección crónica con el subsiguiente daño pulmonar (34).

De forma inherente a la infección crónica y los frecuentes tratamientos antibióticos que el paciente con FQ recibe durante el curso de la enfermedad, *P. aeruginosa* desarrolla numerosas mutaciones (35). A través de este proceso, gradualmente desarrolla resistencia a antimicrobianos a través de varias vías (36). Entre los mecanismos de resistencia se incluyen la presencia de β -lactamasas (AMPc y BLEE), bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembrana (37). Además, aunque no se considere un factor específico de resistencia, la formación de biopelículas puede aumentar adicionalmente la resistencia a los antibióticos impidiendo la penetración física de los antimicrobianos a las bacterias, lo que constituye de hecho un mecanismo *in vivo* propicio para el desarrollo y selección de cepas multirresistentes (15).

En general, *P. aeruginosa* adquiere los mecanismos de resistencia a antimicrobianos por dos vías: a) genes de resistencia transmitidos a partir de elementos móviles genéticos (plásmidos) y b) procesos de mutación de novo (38). Este último era el que más se ajustaba al modelo clásico de *P. aeruginosa* en la FQ: infecciones monomicrobianas con ausencia de otros microorganismos de los que pudiera adquirir mecanismos de resistencia, y la alta densidad de *P. aeruginosa* en la vía aérea, lo que podría favorecer la aparición de mutaciones de novo. Además, como se ha señalado, una de las propiedades que caracteriza el desarrollo de *P. aeruginosa* en el pulmón del paciente con FQ es la hipermutabilidad (39), a diferencia de lo que acontece en las infecciones agudas y en las formas ambientales de *P. aeruginosa* (40). Así se facilitarían la adaptación de este microorganismo a las características particulares del nicho pulmonar, la cronificación del proceso y el rápido desarrollo de resistencias.

1.1.4.1.e Evaluación microbiológica de la colonización-infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*

Resulta fundamental la realización de un seguimiento microbiológico continuo a los niños con diagnóstico precoz de FQ. Uno de los objetivos es la detección de la colonización inicial por *Pseudomonas aeruginosa*, dado que la instauración de tratamientos antimicrobianos agresivos en estos primeros estadios puede prevenir la persistencia de la colonización inicial y retrasar la infección crónica. Una vez establecida la colonización crónica, el seguimiento microbiológico cualitativo y cuantitativo resulta de utilidad para conocer la evolución de la enfermedad pulmonar y determinar la eficacia e impacto de los sucesivos tratamientos antibióticos y así lograr disminuir la carga bacteriana (41).

Actualmente los cultivos de orofaringe y esputo son los que se practican más frecuentemente dada su fácil obtención. Sin embargo el cultivo de las muestras de frotis orofaríngeo tiene un limitado valor predictivo positivo y negativo para la detección de *P. aeruginosa* en el tracto respiratorio inferior (45). Además, la elevada variabilidad de las poblaciones de *P. aeruginosa* que colonizan las vías respiratorias de los pacientes con FQ, consecuencia de la intensa diversificación fenotípica que ocurre en los distintos

compartimentos de la vía aérea, añade un importante grado de complejidad al diagnóstico y seguimiento microbiológico de esta patología. La variabilidad es muy patente en lo relativo a los estudios de sensibilidad antibiótica entre las distintas variantes fenotípicas, y especialmente en los pacientes colonizados por cepas hipermutantes, en los que suele haber presencia de subpoblaciones resistentes a la mayoría de los antibióticos empleados. Esta complejidad poblacional puede ser responsable de la discordancia de los estudios de sensibilidad *in vitro* y la respuesta clínica en el contexto de FQ.

A pesar de la demostrada utilidad del cultivo seriado, éste puede ser negativo en determinadas situaciones, en especial en pacientes con tratamiento antimicrobiano con baja carga bacteriana, o cuando no se pueden obtener muestras respiratorias de suficiente calidad. Por este motivo se han desarrollado técnicas independientes de la presencia de bacterias viables en suficiente cantidad para ser detectadas mediante cultivo convencional, como la respuesta de anticuerpos específicos de *P. aeruginosa*, o la detección de material genético de la bacteria en muestras respiratorias (41). No obstante el cultivo se utiliza en el momento actual como técnica de referencia para la validación de otras técnicas, serológicas o moleculares.

La utilidad de la serología de *P. aeruginosa* se basa en ser una herramienta para identificar infección crónica y diferenciarla de la simple colonización en pacientes con FQ. También resulta útil cuando no se pueden obtener muestras adecuadas para cultivo. Sin embargo, la determinación de anticuerpos frente a *P. aeruginosa* en pacientes con FQ puede dar información sobre una infección previa no detectada mediante el cultivo convencional. Existe alguna controversia en relación a aspectos de su uso clínico (42), por una parte debido a la heterogenicidad de las técnicas estudiadas, y también por la delimitación de puntos de corte en la titulación, en especial en lactantes y niños con FQ (43).

La utilización de técnicas moleculares puede evitar las limitaciones asociadas al cultivo convencional, como lo es, el no aislamiento durante el tratamiento antibiótico o cuando hay baja carga bacteriana. Estas técnicas permiten además, detectar la colonización con *P. aeruginosa* una media de 4,5 meses antes que las técnicas de cultivo (44), lo que permitiría también adelantar la antibioterapia para su erradicación. Los primeros estadios del proceso

suelen cursar con aislamiento esporádico o intermitente de *P. aeruginosa*; la tipificación molecular puede permitir determinar si realmente se trata ya de una colonización crónica, todavía con baja carga bacteriana, o si por el contrario se trata de colonizaciones esporádicas por distintas cepas ambientales. Entre sus limitaciones se encuentra la dificultad para diferenciar el DNA de bacterias vivas y muertas, lo que puede hacer considerar como fracasos, verdaderas erradicaciones terapéuticas. Las técnicas más empleadas son las de amplificación de DNA como la PCR, que identifica gérmenes mediante la amplificación de secuencias únicas de un microorganismo particular teniendo por ello gran especificidad. Las técnicas de PCR utilizadas para detectar *P. aeruginosa* en esputo de pacientes con FQ presentan, en general, alta sensibilidad, del 93 al 100% (45).

1.1.4.1.f Patrones microbiológicos de la colonización-infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*

Basándose en criterios clínicos y microbiológicos, establecidos principalmente por el cultivo tradicional y en ocasiones la serología, se establecen unos patrones de infección/colonización de *Pseudomonas aeruginosa* (46-48):

- Infección inicial (primoinfección). Se establece tras un primer cultivo positivo de *P. aeruginosa* en el curso clínico de la enfermedad. Suelen ser cepas no mucosas, sensibles a los antimicrobianos. Los cultivos negativos después del primer cultivo pueden indicar una infección inicial interrumpida, o infradiagnosticada, o bien una verdadera erradicación de *P. aeruginosa* tras la antibioterapia. Se considera erradicación cuando se obtienen al menos 2 cultivos negativos para *P. aeruginosa* realizados después de 14 días de la finalización del tratamiento y separados como mínimo 2-4 semanas entre ellos. En esta fase, no suele aparecer respuesta inmunológica específica frente a *P. aeruginosa*.

- Infección intermitente. Tras la infección inicial se obtienen resultados positivos y negativos de forma intermitente en cultivos secuenciales. Puede reflejar una infección permanente con bajos niveles cuantitativos, heterogeneidad en la procedencia de las muestras, o erradicación aparentemente transitoria. Es posible la colonización persistente de reservorios, como los senos paranasales. Los gérmenes aislados tienen diferentes

fenotipos, incluyendo cepas mucoides. Puede aparecer respuesta inmunológica específica frente a *P. aeruginosa*.

- Infección crónica. Suele acompañar los estadios avanzados de enfermedad. Aparecen colonias mucoides con diversidad de fenotipos, por la especialización y evolución adaptativa de *P. aeruginosa* a las condiciones de un pulmón ya dañado. Existe una marcada respuesta serológica, consistente con la presencia de *P. aeruginosa*. En esta fase son frecuentes las exacerbaciones, que aunque no tengan una etiología definida, suelen coincidir con un aumento de la carga bacteriana o variaciones antigénicas. En pacientes sin estudio microbiológico puede utilizarse como criterio diagnóstico de exacerbación el aumento de anticuerpos en 2 muestras sucesivas de sangre.

1.1.4.1.g Interacción de *Pseudomonas aeruginosa*, con otras especies, con la flora del huésped y con otros patógenos. Comunicación interespecies

El desarrollo del conocimiento de la microbiota bacteriana en las vías respiratorias de pacientes sanos y con FQ ha reforzado el interés de la posible interacción de *Pseudomonas aeruginosa* por el microbioma del huésped, a través de la comunicación interespecies (Quorum Sensing, QS) (38-40). Se considera que el QS es un atributo común de muchas especies bacterianas mediante el cual las bacterias actúan como una comunidad, pueden usar señales químicas para comunicarse y coordinar actividades beneficiosas para su grupo, así como adaptar su expresión fenotípica en función de la densidad de población de bacterias en su entorno cercano (49).

Es conocido que *P. aeruginosa* desarrolla varios factores de virulencia a través de sistemas de QS, que repercuten sobre el sistema inflamatorio, el deterioro pulmonar y la competición sobre otros microorganismos. Es también responsable del desarrollo de cepas transmisibles de *P. aeruginosa* que se han relacionado con el incremento de mortalidad en pacientes con FQ (39).

La presencia de ciertas moléculas de QS repercute sobre otros microorganismos, inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, o al contrario, favoreciendo el

desarrollo de variantes de colonias de *S. aureus*, que no sólo son más resistentes a antibióticos, sino que a la vez son más difíciles de detectar (40). La expresión de ciertas moléculas de QS en *P. aeruginosa* inhibe también el crecimiento de hongos, como *Candida albicans*.

Se ha documentado la interacción simbiótica de *P. aeruginosa* con *Burkholderia cepacia*, lo que favorece un sinergismo entre especies (50). De esta forma comparten material genético que favorece su adaptación al medio, factores de virulencia y resistencia antibiótica. Ya se había observado con anterioridad que la coinfección con *P. aeruginosa* y *B. cepacia* en pacientes con FQ deterioraba más la función pulmonar que la infección aislada por cada uno de los gérmenes (30).

También se ha observado la existencia de una interferencia recíproca de *Stenotrophomonas maltophilia* y *P. aeruginosa* en pulmón con FQ. *S. maltophilia* podría conferir cierta ventaja adaptativa a *P. aeruginosa* en las condiciones específicas de la infección crónica o, aumentar la virulencia de *P. aeruginosa*, lo que conduce a la exacerbación pulmonar (51).

1.1.4.2 *Staphylococcus aureus*

La colonización por *Staphylococcus aureus* se adquiere progresivamente a lo largo de la enfermedad (52). En los dos primeros años de vida muy pocos niños se encuentran colonizados. Este porcentaje se incrementa progresivamente, hasta que a los 12-14 años el 50-60% de los niños se encuentra colonizados. Conforme avanza la edad del paciente y la progresión de la enfermedad, decrece la colonización por *S. aureus* y aumenta el aislamiento de *P. aeruginosa*, que se incrementa de forma gradual hasta convertirse en el patógeno más frecuente en la edad adulta.

Sigue existiendo un debate sobre el papel que juega el *S. aureus* en el desarrollo de la enfermedad pulmonar crónica en pacientes con FQ. La infección precoz por *S. aureus* puede causar daño epitelial, lo que facilita la adherencia y colonización por *P. aeruginosa* (52). Por este motivo se diseñaron estrategias de tratamiento antibiótico preventivo con el ánimo de impedir la infección y posterior colonización estafilocócica. Con posterioridad se

observó que la profilaxis antibiótica, pese a disminuir el riesgo de infección estafilocócica, incrementaba el riesgo de contraer infecciones por *P. aeruginosa* (53,54), por lo que la profilaxis mantenida antiestafilocócica no estaría justificada.

1.1.4.2.a *Staphylococcus aureus* meticilin resistente

El incremento de la prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilin resistente (SAMR) en la población general se refleja en los pacientes con FQ (14), de forma que en los últimos años se ha ido haciendo cada vez más frecuente el aislamiento de SAMR en este grupo de enfermos. La prevalencia difiere mucho entre países, y entre los motivos se encuentran el porcentaje de portadores en la población general y las políticas de aislamiento de pacientes con FQ en medio hospitalario. Se ha descrito que entre el 3 y el 11% de los pacientes europeos con FQ están crónicamente infectados. Entre los factores de riesgo conocidos para la adquisición de SAMR se encuentran: estancias prolongadas y frecuentes en medio hospitalario, tratamiento antibiótico con ciprofloxacino y cefalosporinas en colonizados por *P. aeruginosa*, formas avanzadas de la enfermedad pulmonar, y la infección crónica por *Aspergillus fumigatus*.

La colonización por SAMR se ha asociado con el deterioro respiratorio y una mayor necesidad de hospitalización comparativamente con los portadores de *Staphylococcus aureus* meticilin sensible (SAMS) (55). Los pacientes con FQ portadores de SAMR tienen un incremento de mortalidad con respecto a los enfermos con similares características que no han estado colonizados (56). Así también, la función respiratoria de los pacientes colonizados a la vez por SAMR y *P. aeruginosa* es significativamente peor que la de los pacientes colonizados por sólo una de las dos especies (57). Aunque no se considera un criterio de exclusión para el trasplante pulmonar, se recomienda un manejo extremadamente cuidadoso de los candidatos a trasplante que sean portadores (58).

Aunque no hay una definición estándar de infección crónica por SAMR, se acepta que esta situación se corresponde con la de aquellos pacientes con tres cultivos positivos en los últimos 6-12 meses. En el momento actual no hay estudios definitivos que demuestren la eficacia y seguridad de los protocolos de tratamiento para SAMR en pacientes con FQ en

los distintos supuestos clínicos (59). Se acepta que el principal beneficio del tratamiento es en pacientes con infección reciente y que presenten una exacerbación pulmonar aguda (60). A diferencia de *P. aeruginosa* y SAMS, hay alguna evidencia a favor de que la colonización crónica por SAMR puede ser erradicada de la vía aérea. En estos casos, además del tratamiento de otras fuentes del SAMR fuera de las vías respiratorias, con mupirocina nasal y baños con clorhexidina, resulta muy importante la adherencia a las medidas de aislamiento y segregación de los pacientes en los centros sanitarios en función de su estado de portador (55).

1.1.4.3 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae se ha considerado el tercer germen más frecuentemente aislado en pacientes con FQ tras *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Tiene especial importancia en los primeros 4-6 años de edad cuando se aísla en aproximadamente el 30-40% de los niños. No obstante, esa prevalencia es coincidente con el porcentaje de portadores de *H. influenzae* en población infantil sana en edad preescolar (61). A partir de esa edad es menos frecuente en pacientes con FQ y generalmente marginal en el adulto.

Las cepas de *H. influenzae* que se aíslan en los pacientes con FQ son no capsuladas, como las encontradas en otras patologías respiratorias crónicas. *H. influenzae* es el probable causante de algunas exacerbaciones agudas y sólo en unos pocos pacientes se establece una infección crónica por este germen, normalmente por clones hipermutables y mejor adaptados a antibióticos (13).

Se ha señalado que puede formar biopelículas en el epitelio de las vías respiratorias, lo que dificulta la acción de los antibióticos e incrementa la respuesta inflamatoria del huésped. Estos datos sugerirían un papel en la enfermedad pulmonar en la edad temprana y puede plantear la conveniencia de tratar la infección precoz asintomática de los pacientes con FQ (62). En el momento actual no existe acuerdo sobre el beneficio del tratamiento antimicrobiano generalizado en los pacientes con FQ colonizados por este patógeno (41), o dirigido sólo en las exacerbaciones y ajustándose al antibiograma (1).

1.1.4.4 *Streptococcus pneumoniae*

La incidencia de *Streptococcus pneumoniae* en pacientes con FQ es mayor en edades tempranas. Algunos datos muestran una incidencia similar de infecciones respiratorias en los pacientes con FQ que en los individuos de la misma edad sin la enfermedad (63). Otros autores han encontrado relación entre su aislamiento y la aparición esporádica de exacerbaciones. Se ha demostrado que la persistencia de *S. pneumoniae* podría producirse a expensas de reemplazos por nuevos clones (64) y que los aislamientos de *S. pneumoniae* obtenidos en pacientes con FQ presentan una mayor resistencia antibiótica que la obtenida en pacientes sin FQ (65).

1.1.4.5 Otros microorganismos

Los pacientes con FQ están infectados predominantemente por unos patógenos considerados clásicos en la enfermedad, de los cuales *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* son los más importantes. Sin embargo, en los últimos años ha habido un creciente número de informes sobre gérmenes emergentes potencialmente patógenos como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, enterobacterias o micobacterias no tuberculosas, virus y hongos como *Pneumocystis jirovecii*.

1.1.4.5.a *Burkholderia cepacia* complex

En el paciente FQ, la infección respiratoria por *Burkholderia cepacia* tiene una prevalencia mucho menor que la producida por otros gérmenes. Sin embargo, tanto por la importante repercusión clínica como por su transmisibilidad, ha pasado a ser un germen considerado de gran importancia en la evolución clínica de los pacientes con FQ (66).

Taxonómicamente no se trata de una única especie, sino de un grupo de hasta 9 especies genómicas denominadas “genomovars”, con características fenotípicas similares, pero con genotipos diferentes, al que se denomina “complejo *Burkholderia cepacia*” (BCC).

Todas ellas han sido aisladas de pacientes con FQ, pero la mayoría de los aislamientos pertenecen a los genomavares II y III (67). El genomovar tipo III (*B. cenocepacia*) es considerado como el más agresivo para los pacientes y con mayor transmisibilidad. La prevalencia global en distintas series de *B. cepacia* es del 3-5%, predominando en pacientes adultos.

Se han descrito diferentes patrones de infección por este germen, desde el portador asintomático al deterioro rápidamente progresivo (68). Está demostrado que la adquisición de *B. cepacia* provoca en algunos pacientes un empeoramiento de la función respiratoria y del estado nutricional, factores que determinan la supervivencia del paciente. Además, uno de cada cuatro sujetos infectados sufre una neumonía necrotizante aguda progresiva, muchas veces inevitablemente mortal. Esta complicación, denominada *síndrome cepacia*, se relaciona con el genomovar tipo III. Los pacientes previamente colonizados por *B. cepacia* tienen peor pronóstico post-trasplante que los no colonizados, por lo que se ha planteado si la colonización por *B. cepacia* es una contraindicación absoluta para el trasplante pulmonar.

El diagnóstico de estos microorganismos no es sencillo mediante el cultivo, y se han descrito problemas en su aislamiento con el uso de algunos sistemas comercializados. Las técnicas moleculares también se han utilizado con éxito para detectar *B. cepacia* complex a partir de muestras respiratorias de pacientes con FQ, mediante diferentes cebadores diseñados para amplificar el gen *recA*, regiones conservadas del gen 16S ARNr, o la región espaciadora 16S a 23S (70).

Dado que el *B. cepacia* complex es en muchas ocasiones intrínsecamente resistente a aminoglucósidos, y frecuentemente multirresistente, el tratamiento consiste en la asociación de tres antibióticos bactericidas. Los estudios del genotipo de estas especies muestran una posible infección cruzada entre pacientes, por lo que las políticas de aislamiento son cruciales (71).

1.1.4.5.b *Stenotrophomonas maltophilia*

La prevalencia de colonización por *Stenotrophomonas maltophilia* en pacientes con FQ ha aumentado en los últimos años; se estima un 10% en población adulta (72), aunque varía de unos centros a otros, en parte, por el uso de diferentes medios de cultivo selectivos. Su papel como patógeno es controvertido. Por una parte, en algunos estudios se ha demostrado una peor supervivencia en los portadores crónicos, pero en otros no se encuentra que el aislamiento de este germen se asocie con un deterioro significativo de la función pulmonar, por lo que la necesidad o no de tratar, no está claramente establecida (73). Hay factores que predisponen a la colonización por este microorganismo, como el uso crónico de antimicrobianos orales, intravenosos o aerosolizados (74).

1.1.4.5.c *Achromobacter xylosoxidans* (antes *Alcaligenes*)

Achromobacter xylosoxidans se detecta hasta en el 18% de los cultivos en los pacientes que inician la tercera década de vida. Son factores de riesgo de colonización la utilización previa de antibióticos, las hospitalizaciones frecuentes (75) y, en alguna serie, la presencia de *Aspergillus fumigatus* en el esputo. Su significado tampoco está claro, dado el bajo número de pacientes que sufre colonización crónica (76). Se han descrito en pacientes que sufren exacerbaciones agudas, pero suelen producirse en pacientes también colonizados por *P. aeruginosa*. Suele aislarse en pacientes con una función pulmonar más deteriorada, aunque por sí misma, su adquisición no parece empeorar la situación pulmonar de los pacientes (77). Es un organismo muy resistente a antibióticos, pero su erradicación en fases iniciales mediante antibioterapia inhalada es factible y retrasa la infección crónica (78).

1.1.4.5.d *Enterobacterias*

Las enterobacterias se pueden aislar en muestras del tracto respiratorio de pacientes con FQ. Se consideran colonizadores transitorios, se encuentran en baja densidad de colonización y no se ha encontrado que estén asociados con enfermedad grave (79).

1.1.4.5.e Micobacterias no tuberculosas

Mientras que la infección tuberculosa es infrecuente en la FQ, se ha observado que los pacientes con esta enfermedad tienen predisposición a sufrir colonización-infección respiratoria por micobacterias no tuberculosas (MNT) (80), probablemente debido a la presencia de bronquiectasias y a las infecciones crónicas y recurrentes del pulmón. Las especies que son aisladas con mayor frecuencia son *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, seguida de *Mycobacterium abscessus* (81).

MNT tienen una distribución amplia en la naturaleza y se encuentran principalmente en el agua, suelo, plantas y animales. El origen de la infección es raramente el contacto entre personas y el serotipo de las cepas aisladas en los pacientes ha demostrado la ausencia de transmisión cruzada entre ellos. Tampoco se ha podido demostrar la transmisión nosocomial a través de los aerosoles u otras fuentes de infección sanitarias (82).

El mayor número de aislamientos de estos gérmenes puede deberse a la mejora en las técnicas de detección y al incremento de la esperanza de vida de los enfermos (83). Se ha observado una mayor frecuencia en pacientes colonizados por *S. aureus*, pero no por *P. aeruginosa* (14). La prevalencia se incrementa paulatinamente con la edad, siendo superior al 15% en mayores de 14 años. No obstante, como en otros gérmenes, la obtención de muestras de esputo inducido viene condicionada por la edad del paciente y puede subestimar la prevalencia real en niños más pequeños (84). Existen variaciones en las técnicas empleadas para su aislamiento y detección (85), lo que puede explicar las diferencias en cuanto a prevalencia observada en la literatura (86). También la presencia de bacterias de crecimiento rápido en el esputo de los pacientes con FQ puede condicionar un infradiagnóstico de MNT y también algunos métodos de aislamiento pueden inactivar a las micobacterias, sobre todo en muestras con baja carga de microorganismos.

La distinción entre infección pulmonar activa y colonización no es fácil en la práctica diaria en el paciente con FQ (1), sin que se haya podido establecer con claridad su verdadero papel como patógenos. Empleando criterios clínicos y bacteriológicos, hay autores que afirman que MNT son las responsables de una enfermedad subclínica activa

durante mucho tiempo y que contribuyen al deterioro progresivo de la función pulmonar (87). Los pacientes con aislamiento de *M. abscessus* cumplen los criterios bacteriológicos con mayor frecuencia que los pacientes con cultivo positivo a MAC (88). El problema es la coexistencia de MNT con *P. aeruginosa* y *S. aureus*, lo que dificulta aún más determinar su papel como patógenos. Su significación patógena vendría ligada a la existencia de múltiples cultivos positivos, la falta de respuesta al tratamiento bacteriano convencional y la observación en la tomografía computerizada de alta resolución (TACAR) de nódulos y lesiones granulomatosas, confirmados por biopsia (89). En estos casos se recomienda iniciar tratamiento específico, que se ha demostrado que logra la mejoría clínica con la negativización de los cultivos en estas situaciones (90). No obstante, no se han encontrado diferencias entre los distintos regímenes antibióticos (91).

1.1.4.5.f Hongos levaduriformes y *Aspergillus spp*

Además de la colonización bacteriana del pulmón y vías respiratorias, se produce en muchos casos una colonización fúngica, posiblemente favorecida por el tratamiento antibiótico agresivo (92). Los hongos que se cultivan con más frecuencia en las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ son *Aspergillus fumigatus* y *Candida spp* (93). Hasta un 50-75% de los pacientes en fases avanzadas están colonizados por *Candida spp*, siendo considerado como un comensal inofensivo. Otras especies de hongos se aíslan con relativa frecuencia, sin que su papel como patógenos de la enfermedad pulmonar pueda establecerse con claridad (82).

A. fumigatus suele encontrarse en las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ con una frecuencia que oscila entre un 10 y un 57% (13). Las especies de *Aspergillus spp* son responsables de varias patologías en pacientes con FQ (94): aspergilosis invasiva, aspergiloma, neumonitis por hipersensibilidad con obstrucción bronquial, como la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), además de una respuesta inflamatoria crónica y un daño directo al epitelio pulmonar. No se conoce con exactitud por qué el hongo desencadena una u otra enfermedad, pero puede depender de factores individuales determinados genéticamente, como la respuesta a la IgE total, inmunocompetencia, grado de cronicidad de la enfermedad y lugar de asiento de la colonización o infección fúngica. Se ha propuesto *A. fumigatus* como responsable ocasional de exacerbaciones en los pacientes

con FQ. En estos casos se propone el tratamiento antifúngico en los pacientes colonizados por *A. fumigatus* con deterioro respiratorio y sin respuesta al tratamiento antibiótico (95). No obstante, aunque la colonización con *A. fumigatus* se encuentra más comúnmente en pacientes con enfermedad pulmonar más grave, hay trabajos en los que no se ha asociado de forma independiente con deterioro de la función pulmonar de pacientes por períodos de más de 5 años (96). Tampoco se recomienda su erradicación en pacientes asintomáticos colonizados (6).

Tras *Aspergillus*, el segundo hongo filamentoso más encontrado, es *Scedosporium apiospermum*. Aunque a nivel general, no se ha establecido su papel como patógeno, se han descrito casos con muy mala evolución pulmonar con la combinación de su aislamiento persistente y una inflamación intensa (97). Otras especies de hongos aisladas incluyen *Wangiella dermatitidis* y *Penicillium emersonii* (6).

1.1.4.5.g *Pneumocystis jirovecii*

Pneumocystis jirovecii es un hongo oportunista atípico de amplia distribución mundial con afinidad por el tejido pulmonar y es causante de neumonía en individuos inmunodeprimidos y de diversas enfermedades pulmonares crónicas (98). El cultivo sigue siendo inviable hoy día y el diagnóstico se basa en la visualización microscópica por inmunofluorescencia, requiriendo que el organismo esté en la densidad suficiente para su diagnóstico en las muestras obtenidas. El desarrollo de técnicas moleculares sensibles ha llevado al reconocimiento de un estado de colonización, o portador de *P. jirovecii*, en el que existe una baja carga de esta especie en personas que no tienen neumonía, con predominio de determinados genotipos (99). La prevalencia de *P. jirovecii* en pacientes con FQ ha dado resultados dispares, de 1,3% a 21,6% (100,101), lo que puede estar motivado por la heterogenicidad de los pacientes y la metodología empleada.

La evolución de la colonización de *P. jirovecii* en pacientes con FQ es en gran parte desconocida, siendo necesario esclarecer el papel de la infección por *P. jirovecii* en la historia natural de la FQ con el fin de mejorar el manejo clínico de esta enfermedad (98). La colonización por *P. jirovecii* puede inducir cambios inflamatorios en un pulmón con FQ,

colaborar en el daño pulmonar crónico y en el empeoramiento de la función pulmonar. Además puede interactuar con las bacterias de las vías respiratorias (102).

1.1.4.5.h Virus respiratorios y otras bacterias

En los últimos años se ha evaluado en los pacientes con FQ el impacto de las infecciones por distintos virus, como el virus respiratorio sincitial (VRS), virus de la gripe, adenovirus, virus parainfluenza, rinovirus, metapneumovirus, coronavirus o bocavirus (103-105). También se ha considerado la implicación de bacterias atípicas como *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *Legionella pneumophila* (106), que si bien ahora pueden ser detectadas por técnicas moleculares rápidas y directas, su presencia en los pacientes con FQ probablemente haya estado subestimada (107). La incidencia en estos pacientes no es mayor que en la población general y en niños menores de 5 años incluso es más baja, debido probablemente a una exposición menor, con la excepción de *B. pertussis* que justo en ese rango de edad presenta una de las tasas más elevadas. Sin embargo, la infección respiratoria puede ser mucho más grave con mayor afectación de vías inferiores, mayor incidencia de exacerbaciones agudas, hospitalización y deterioro de la función pulmonar (14). Además, puede predisponer a la infección bacteriana al lesionar el epitelio respiratorio y facilitar la adherencia de *P. aeruginosa* (108). En algunos trabajos se ha observado que un mayor número de infecciones virales al año se correlaciona con progresión de la enfermedad pulmonar, disminución del índice de Swachman, y también que la infección vírica precede en muchas ocasiones a los episodios de exacerbación aguda (109-110). En contraste, en estudios realizados en pacientes con bronquiectasias no relacionadas con FQ, ni las bacterias atípicas ni el VRS se mostraron como responsables de exacerbaciones respiratorias (111).

1.1.5 Estrategias de estudio de infección y terapia antibiótica

La terapia antimicrobiana en pacientes FQ está dirigida a la prevención, erradicación y control de la infección respiratoria (10). La utilización de antibióticos en pacientes con enfermedad pulmonar, ha contribuido al control de la infección bronquial y las expectativas de supervivencia (112).

Los objetivos terapéuticos difieren a lo largo del curso clínico de la enfermedad (13). La erradicación de especies como *H. influenzae*, *S. aureus*, o *P. aeruginosa* ante su primer aislamiento se considera objetivo en los pacientes pediátricos, para así evitar la colonización crónica. Generalmente, estos microorganismos pueden erradicarse con el tratamiento adecuado, si bien, sobre todo en el caso de *S. aureus* es posible que se establezca una infección permanente. Progresivamente, a la vez que se establece la colonización crónica, el objetivo primordial del tratamiento pasa de la erradicación al control de la infección, el tratamiento de mantenimiento y el control de las exacerbaciones periódicas (113). El tratamiento antibiótico durante la exacerbación reduce los síntomas y mejora la función pulmonar (88). Cada vez más se considera que el papel de la terapia antimicrobiana en pacientes con enfermedad pulmonar crónica debe dirigirse hacia el control del comportamiento de las especies colonizantes agresivas, en vez de la erradicación completa, que pocas veces es viable (83).

El resultado positivo de un cultivo de esputo, o exudado orofaríngeo, generalmente condiciona el inicio de un tratamiento antibiótico, especialmente cuando existen síntomas asociados. Esto supone un abordaje diferente al de la población general, en la cual la mayoría de las infecciones respiratorias se resuelven sin necesidad de empleo de antibióticos.

La monitorización del cultivo de esputo, o de las muestras orofaríngeas en niños no colaboradores, resulta fundamental para identificar los microorganismos implicados y determinar su perfil de sensibilidad antibiótica (6). La elección del tratamiento antimicrobiano, sobre todo en el caso de bacterias multirresistentes, debe estar basada en estudios de sensibilidad antibiótica.

1.1.5.1 Estudios microbiológicos clásicos. Limitaciones

Pese a las diferencias en los objetivos terapéuticos en las distintas fases de la enfermedad, el papel que juega el diagnóstico microbiológico con técnicas dependientes de cultivo es el mismo: la detección de la presencia de un limitado grupo de patógenos con relevancia clínica conocida y el estudio de la sensibilidad antibiótica.

La capacidad de estas técnicas microbiológicas dependientes de cultivo presenta algunas limitaciones (113). Hay importantes diferencias entre la forma en que las bacterias crecen in vitro a la forma en la que se comportan en las vías respiratorias de pacientes con FQ, mostrando modelos de crecimiento o de susceptibilidad antibiótica diferentes a los que presentan en laboratorio. Los medios de cultivo tradicionales han sido intencionadamente restrictivos para favorecer el crecimiento de bacterias consideradas clínicamente relevantes (114), pero que impiden el crecimiento y por tanto la identificación de numerosas especies también presentes en las vías respiratorias de los pacientes con FQ, lo que puede sobre o infraestimar la abundancia de determinadas especies.

Además del rendimiento de los medios de cultivo tradicionales, existen limitaciones en relación al origen de las muestras obtenidas. Aunque en muchas ocasiones el cultivo de las secreciones orofaríngeas es la única muestra disponible (115), no siempre se puede considerar como un indicador representativo de la infección de todo el tracto respiratorio inferior. Frente a muestras obtenidas con el cultivo del lavado broncoalveolar (BAL), considerado como referencia, el cultivo del esputo presenta valores predictivos positivos entre el 40-80% para *P. aeruginosa* y valores predictivos negativos entre el 70-97% (7). En niños menores de 5 años, la obtención de esputo muchas veces no es viable, y se ha de recurrir a frotis orofaríngeos, en los que la sensibilidad y el valor predictivo positivo son más pobres que en los de las muestras de esputo.

1.2 Estudio del microbioma de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística

El número de microorganismos cultivables es mucho menor que el de los no cultivables. El desarrollo de técnicas microbiológicas basadas en la biología molecular ha permitido la proliferación de estrategias independientes del cultivo para la identificación de microorganismos. Algunas de estas técnicas se han comenzado a aplicar en el estudio diagnóstico de muestras de pacientes con FQ, bien de forma específica para patógenos considerados clave como *P. aeruginosa*, o de forma generalizada abarcando un alto número de microorganismos como para el estudio del microbioma (116).

1.2.1 Microbioma y otros conceptos

Se denomina **microbiota** al conjunto de microorganismos presentes en un medio ambiente determinado. El término **metagenoma** se refiere al conjunto de genomas y genes de los miembros de la microbiota y el término **microbioma** se define a la totalidad del habitat, incluyendo los microorganismos (bacterias, archaea, eukaryota inferior y superior y virus), su genoma (es decir, los genes) y las condiciones ambientales del entorno, es decir, es el ecosistema que engloba los microorganismos de un determinado ambiente junto con las interacciones de sus genes (117-118).

En las distintas regiones del cuerpo humano, durante las diversas fases de la vida y en los estados de salud y enfermedad se producen cambios en la composición de las comunidades bacterianas que habitan en él, lo que determina una biogeografía de las comunidades por el organismo (119-120). Además se ha observado una variabilidad entre individuos sanos en la composición de la microbiota de distintas localizaciones como el intestino, la piel o la vagina.

El desarrollo de técnicas de biología molecular y análisis metagenómico han supuesto una revolución en microbiología ecológica (121), realizándose estimaciones por las que tan sólo se consigue cultivar en laboratorio entre el 0,001 - 1% de las bacterias ambientales,

generando conceptos como “la anomalía de recuento de la gran placa”(122). Esta desproporción entre los gérmenes cultivables y los que habitan los distintos nichos del cuerpo humano probablemente no es tan dramática, aunque se considera que la mayor parte de la composición de la microbiota ha sido desconocida hasta la fecha (123). El descubrimiento del microbioma se ha acompañado de un desarrollo de estudios ecológicos para determinar cómo se establece, mantiene y pierde la homeostasis en las distintas comunidades de especies de un hábitat.

1.2.1.1 Identificación bacteriana mediante secuenciación del gen ARNr 16 S

El ARN ribosómico (ARNr) 16S o gen de la subunidad pequeña ribosómica es la macromolécula más ampliamente empleada para establecer relaciones filogenéticas y taxonómicas bacterianas (124), dado que es un componente altamente conservado de los ribosomas de procariontes.

Los ribosomas son complejos macromoleculares de ácidos ribonucleicos encargados de sintetizar, a partir del ARN mensajero, las proteínas. Los procariontes tienen ribosomas 70S, constituidos por una subunidad pequeña (30S) y una subunidad grande (50S). La pequeña está compuesta por el 16 ARNr y 21 proteínas.

El gen 16S ARNr es buen marcador para discriminar diferentes microorganismos porque tiene aproximadamente una longitud de 1,5 kpb y contiene 9 regiones variables intercaladas entre regiones conservadas (*Figura 3*). La longitud de estas regiones hipervariables varía entre 50 y 100 pb, y difieren en su utilidad para la identificación bacteriana (125-127).

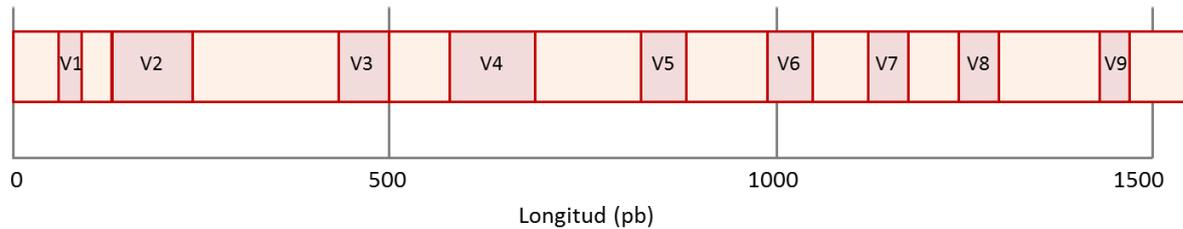


Figura 3: Regiones conservadas e hipervariables (V1-V9) del gen 16S ARNr [Tomado de Cox y cols (125)].

La agrupación de secuencias a un determinado nivel de identidad y el recuento del número de representantes en cada agrupación es en lo que se basa el análisis del gen 16S ARNr. A sí pues, debido a que durante la secuenciación se puede producir algún error, no es exigible un 100% de identidad entre las secuencias, ya que trataría a genomas iguales como diferentes microorganismos. Se acepta un grado de divergencia del 95-99% normalmente. A la agrupación de secuencias se les denominan *operational taxonomic units (OTUs)*.

La precisión en la identificación depende de la base de datos de referencia que se elija. Hoy día existen tres bases de datos controladas y verificadas con las secuencias del 16S ARNr, The Ribosomal Database Project (128), GreenGenes (129), y SILVA (130), en las que las secuencias se pueden alinear y obtener una buena identificación. De este modo, se puede describir la comunidad bacteriana en términos de qué OTUs están presentes y su abundancia relativa. Además, para analizar este tipo de datos hay varios programas bioinformáticos entre los que destacan, QIIME (131) y Mothur (132), aunque no hay ningún método estandarizado que describa como aplicar estos programas a los datos.

1.2.1.2 Análisis de la comunidad microbiana

No sólo es importante conocer la identificación de los microorganismos presentes sino también saber cómo se estructura la comunidad mediante índices que miden la riqueza de especies, su uniformidad y la diversidad. Varias enfermedades en humanos se han relacionado con una disminución en la diversidad de la microbiota, como por ejemplo, la enfermedad inflamatoria intestinal y la fibrosis quística (133).

Para medir la diversidad de la población existen diferentes parámetros.

Términos importantes a considerar:

- **Abundancia:** cantidad relativa de individuos de cada una de las especies.

- **Alfa-diversidad:** es la riqueza de especies de una comunidad particular a la que consideramos homogénea (208).

- **Beta-diversidad:** es el grado de diferencia en la composición de especies entre distintos hábitats, comunidades o individuos, también definida como el cambio biótico a través de gradientes ambientales (207).

- **Índice de Shannon, Chao1, Simpson:** son parámetros que miden la α -diversidad de una muestra. A partir de estos valores, se pueden crear las curvas de rarefacción, que representan la relación entre el número de secuencias recogidas de una muestra y el número de taxones diferentes presentes, en base a las abundancias detectadas.

- **Índice de disimilitud de Bray-Curtis:** es una medida que permite estimar la β -diversidad. A partir de este índice, se puede representar a través del análisis de los componentes principales, que permiten extraer y visualizar los componentes de variación más informativos de un grupo de datos complejo y multidimensional. Así, se hace una transformación de los datos presentes en una matriz de distancias a unos nuevos ejes octogonales de forma que la primera coordenada explica el mayor porcentaje de variación y así sucesivamente.

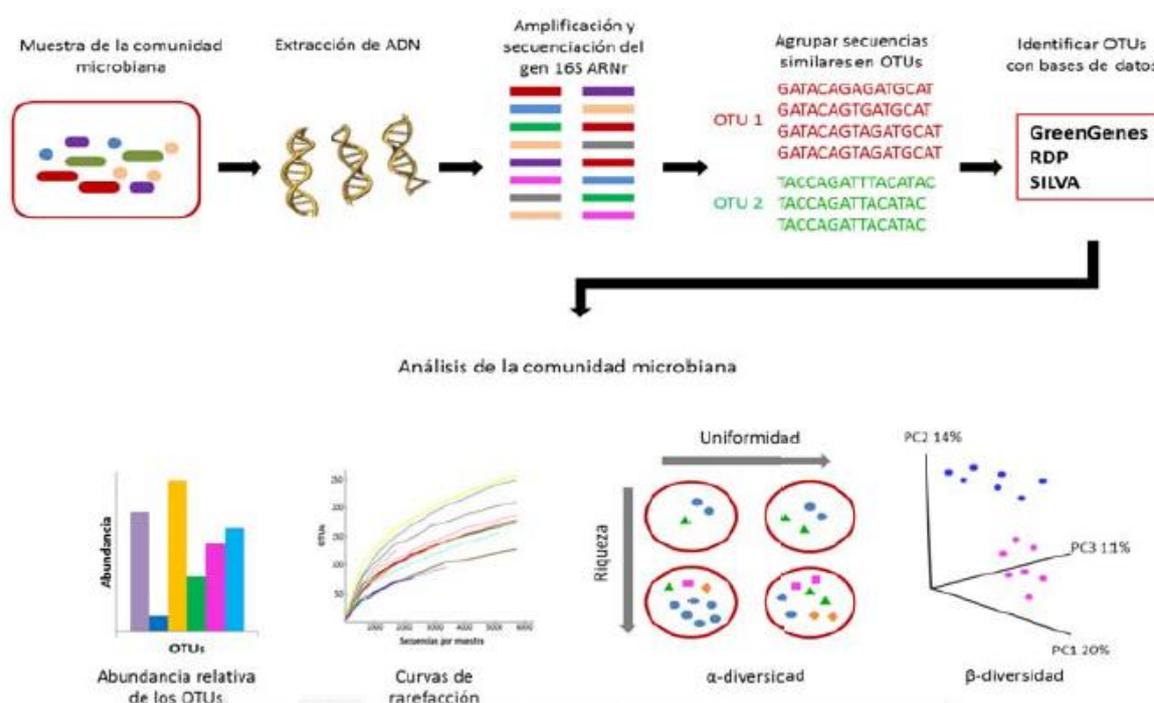


Figura 4: Flujo de trabajo en los estudios de la microbiota basados en la secuenciación del gen 16S ARNr. [Tomado de Morgan y cols (127)]

En la medicina personalizada del futuro, la microbiota representa un componente clave, en primer lugar porque se ha asociado un gran número de enfermedades con la función de la microbiota, como la obesidad, la diabetes, la depresión, la fibromialgia, el autismo y la alergia (134) y en segundo lugar porque la microbiota es extraordinariamente plástica, puede cambiar su metagenoma en horas y su metatranscriptoma en minutos en respuesta a perturbaciones como la toma de antibióticos o la variación en la dieta, lo que abre la posibilidad a nuevos tratamientos.

No ha sido hasta los últimos años cuando se ha empezado a conocer la importancia de los millones de microorganismos que viven en nuestro cuerpo como explicación a una proporción de nuestro metabolismo y nuestro estado de salud-enfermedad. El reto consiste en establecer las relaciones entre la microbiota y el huésped humano en las diferentes partes del cuerpo, y como varían estas relaciones en el caso de enfermedad, con el fin de aplicarlo al beneficio clínico.

1.2.2 Equipos de secuenciación

La revolución de la microbiología de los últimos años está basada en la evidencia de que es mayor el número de microorganismos existente, que el cultivable, de ahí que muchos investigadores vieran la necesidad de su estudio.

Los sistemas clásicos de secuenciación, basados en las estrategias de secuenciación específica de Sanger (135), tan sólo podían secuenciar fragmentos pequeños del genoma bacteriano (500-100nt). Estas técnicas únicamente permitían identificar especies aisladas, y no podían ser aplicadas en el diagnóstico de infecciones polimicrobianas. La aplicación de esta metodología permitió la identificación de microorganismos cuya diagnóstico por métodos tradicionales resultaba muy difícil, como gérmenes no cultivables, de muy lento crecimiento, sin una caracterización fenotípica claramente establecida, o que cuyas características bioquímicas no se adaptaban a las de ningún género o especie reconocidas (136).



Figura 5: Sequencing Cost and DataOutput Since 2000

Estas técnicas de secuenciación han dominado los estudios genómicos durante muchos años, consiguiendo logros como la secuenciación del genoma humano. Sin

embargo, sus limitaciones mostraron la necesidad de incorporar nuevas técnicas de secuenciación, conocidas como **secuenciación de nueva generación** (NGS, del inglés next-generation sequencing) (137). Los nuevos equipos de secuenciación aparecieron en el año 2005 y se caracterizan por tener diferentes mecanismos para la obtención de los datos y poder generar muchas más secuencias por carrera a un precio más barato. A partir de ese año, ha habido un gran desarrollo de la tecnología y las diferentes compañías han ido mejorando sus equipos para aumentar el número de secuencias generadas en cada carrera, aumentar la longitud de las secuencias, disminuir los costes y mejorar la precisión (138).

Estos equipos, también denominados de **secuenciación masiva**, a pesar de tener especificaciones diferentes, comparten ciertas características. La preparación de la muestra es más simple que en la secuenciación Sanger, en vez de un clonaje del DNA, la librería se forma mediante la ligadura de unos adaptadores, secuencias específicas de DNA, a los extremos del DNA que se quiere secuenciar. Además, algunos equipos requieren una amplificación de la librería para asegurar que la reacción de secuenciación produzca suficiente señal para que sea detectada. Y por último, estos aparatos producen una serie de reacciones secuenciales y repetitivas que se detectan automáticamente (139).

Los distintos equipos de secuenciación de nueva generación son:

- ILLUMINA®
- ROCHE® 454 GS FLX
- LIFE TECHNOLOGIES® SOLiD
- ION TORRENT® (Life Technologies®)
- PACIFIC BIOSCIENCES® RS

1.2.2.1 Illumina®

La secuenciación en Illumina está basado en el concepto secuenciación por síntesis y comienza con una amplificación en medio sólido. Una mezcla de fragmentos de DNA de cadena sencilla, con unos adaptadores en los extremos, se unen a una superficie de cristal

mediante hibridación de los adaptadores a los oligonucleótidos complementarios fijados en el cristal. Mediante una amplificación en puente, amplificación de los fragmentos mediante los cebadores adyacentes, se forma una agrupación de secuencias idénticas (cluster). Así en el cristal se producen cientos de millones de agrupaciones, cada uno con aproximadamente 1000 copias del mismo DNA molde (140) (Figura 6).

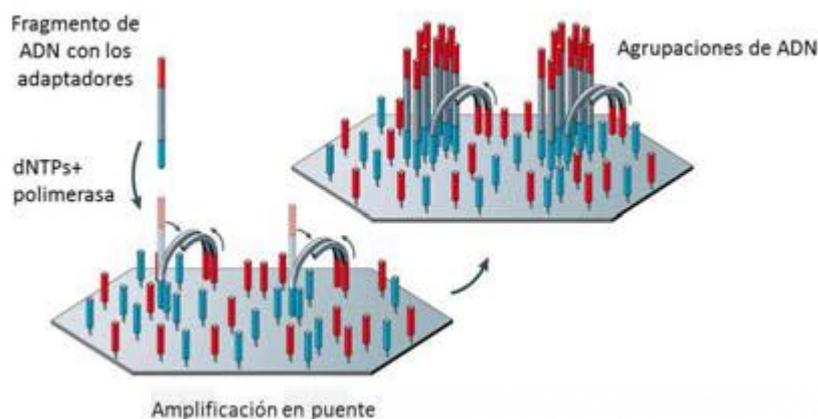


Figura 6: Detalle de la amplificación en puente en la superficie de cristal y creación de las agrupaciones de DNA. Adaptado de Metzker ML (140)

La superficie de cristal es introducida en el aparato y se añaden la polimerasa y los cuatro nucleótidos marcados fluorescentemente y con sus extremos 3'-OH bloqueados para asegurar que se añade tan solo un nucleótido por ciclo. Al añadir un nucleótido, se hace un lavado que elimina los otros 3 nucleótidos no usados, y se identifica el añadido mediante el marcaje fluorescente. Para finalizar, se hace desaparecer el marcaje fluorescente y se desbloquea el extremo 3' del nucleótido para poder seguir con la incorporación de nuevos nucleótidos.

Un sesgo común de este equipo son las sustituciones de bases, sobre todo cuando el nucleótido que se ha añadido previamente es una guanina. A esto se añade una baja representación de regiones ricas en AT y una sobrerepresentación de regiones ricas en CG en los análisis hechos con Illumina, probablemente por un error producido al preparar el DNA molde (137,139,140). No obstante este sistema es el que domina actualmente en el mercado de secuenciadores masivos.

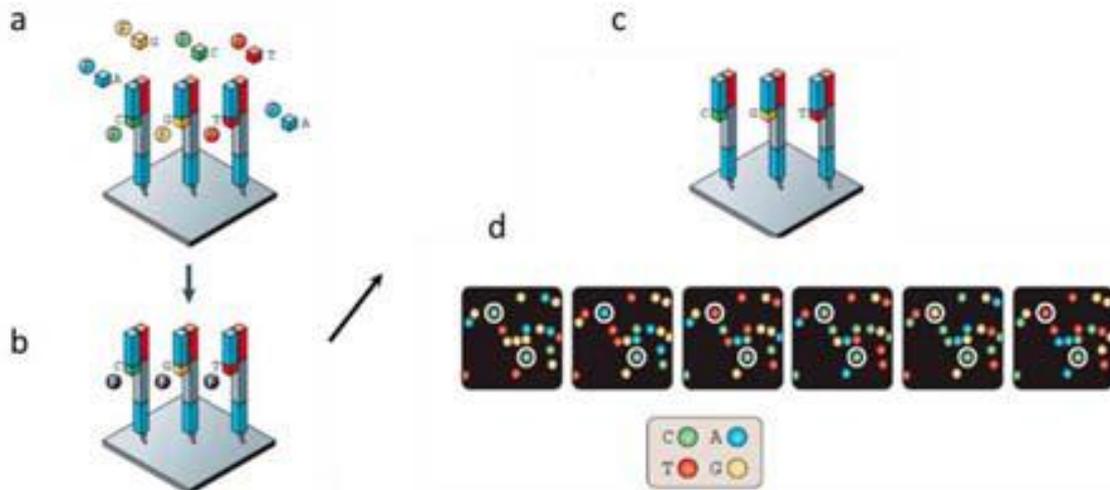


Figura 7: Secuenciación en Illumina. a) y b) se añaden los cuatro nucleótidos con los extremos 3' bloqueados y unidos a un marcador fluorescente, que compiten entre sí para unirse complementariamente a la secuencia. c) Una vez unidos, se recoge la imagen y se elimina el marcador fluorescente y se regenera el extremo 3' para seguir con la secuenciación. d) Imagen que recoge el equipo que se transformará en la información de la secuencia. Adaptado de Metzker ML (140)

1.2.3. Microbioma en las vías respiratorias en estado de salud y enfermedad

Los estudios de secuenciación masiva han expandido la apreciación de la diversidad y abundancia de comunidades bacterianas en el tracto respiratorio en pacientes sanos y en aquellos con FQ (141).

Durante años, en base a los métodos dependientes de cultivo se pensaba que las vías respiratorias inferiores eran tejidos estériles, y que los gérmenes que llegaban aerosolizados eran rápidamente eliminados por mecanismos inmunitarios (142). Frente a esta concepción clásica del pulmón como órgano estéril, los métodos de identificación bacteriana independientes de cultivo muestran de forma consistente que las vías respiratorias inferiores y el tejido pulmonar albergan en estados de salud múltiples y

complejas comunidades bacterianas (143-145). Desde el punto de vista del microbioma, el pulmón puede considerarse como una estructura compleja compuesta por células pertenecientes a los tres ámbitos de la vida en la Tierra, Eukarya, Bacteria y Archaea, así como virus, incluso en individuos sanos (146).

Con las técnicas de detección molecular se están pudiendo identificar la composición del microbioma de las vías respiratorias, que corresponde a un ecosistema dinámico, tanto en estados de salud y enfermedad (147,148) e íntimamente asociado con la respuesta inflamatoria del huésped. No se conoce con seguridad la evolución de la microbiota en los individuos a lo largo del tiempo. Mientras algunos estudios han documentado estabilidad en la microbiota en niños y adultos, otros han encontrado alta variabilidad y diversidad (149). En estudios realizados en población sana, se ha detectado un microbioma pulmonar con idéntica composición de bacterias que el de las vías respiratorias, pero en menor número absoluto, lo que sugiere que las comunidades bacterianas del tejido broncopulmonar proviene de las vías respiratorias superiores, probablemente por un mecanismo de microaspiración repetida. No obstante, también se han encontrado en el mismo estudio, aunque se han detectado en bajo número, bacterias específicas del pulmón (144).

El avance en el conocimiento de la composición de la microbiota pulmonar ha sugerido que muchas enfermedades no son provocadas por un solo microorganismo, sino por el resultado de la alteración del ecosistema respiratorio, con varios microorganismos actuando sinérgicamente (150). En este contexto, se ha considerado a la infección polimicrobiana como un ejemplo de comunidad bacteriana, que interactúa con otras comunidades de bacterias coexistiendo en un determinado ambiente (151). El estudio del microbioma de muchas infecciones humanas pone de manifiesto que el impacto de la comunidad bacteriana como un todo es mayor que la simple suma de sus partes, lo que refuerza la importancia de la inclusión de estrategias de análisis ecológicos de las comunidades bacterianas, sobre todos en enfermedades pulmonares complejas como la FQ (152). No obstante, la metacomunidad microbiana representa sólo una parte de un sistema dinámico de infección. La patogenicidad y virulencia microbiana son insuficientes si no se incorpora la contribución del huésped en el proceso de la enfermedad.

Estas técnicas proporcionan un método válido para cuantificar el número absoluto y la diversidad de especies. También permiten comparar la microbiota en situaciones de estabilidad y deterioro clínico (47), y ayudan a perfilar mejor la ecología de las infecciones pulmonares crónicas en pacientes con FQ (136).

1.2.4 Microbioma en pacientes con fibrosis quística

Los estudios basados en técnicas independientes de cultivo están ampliando nuestra apreciación de la diversidad y abundancia de las comunidades bacterianas en las vías respiratorias en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas como la FQ (142). La integración del análisis molecular en el estudio habitual en los pacientes con FQ puede proporcionar una visión novedosa en la percepción de la evolución microbiológica de la enfermedad.

1.2.4.1 Diferencias en la composición del microbioma entre pacientes con fibrosis quística y pacientes sanos

Las comunidades microbianas de las vías respiratorias inferiores de los niños estables con FQ y los niños sin la enfermedad, muestran diferencias significativas en la diversidad global. Estas discrepancias indican una alteración de la microbiota de las vías respiratorias que ocurre en fases tempranas de la vida de niños con FQ (153).

1.2.4.2 Composición del microbioma en pacientes con fibrosis quística

Hasta la fecha, los métodos diagnósticos basados en cultivo habían implicado a un reducido número de patógenos bacterianos relevantes en la enfermedad pulmonar de la FQ. Los patógenos clásicos son representativos de dos grandes grupos en los que se dividen las bacterias, *Proteobacteria* (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Achromobacter xylosoxidans*) y *Firmicutes* (*Staphylococcus aureus*) (154). En contraposición, los estudios

basados en técnicas de secuenciación masiva han revelado que las bacterias en las vías respiratorias de pacientes con FQ cubren un rango filogenético mayor que el previamente conocido (155).

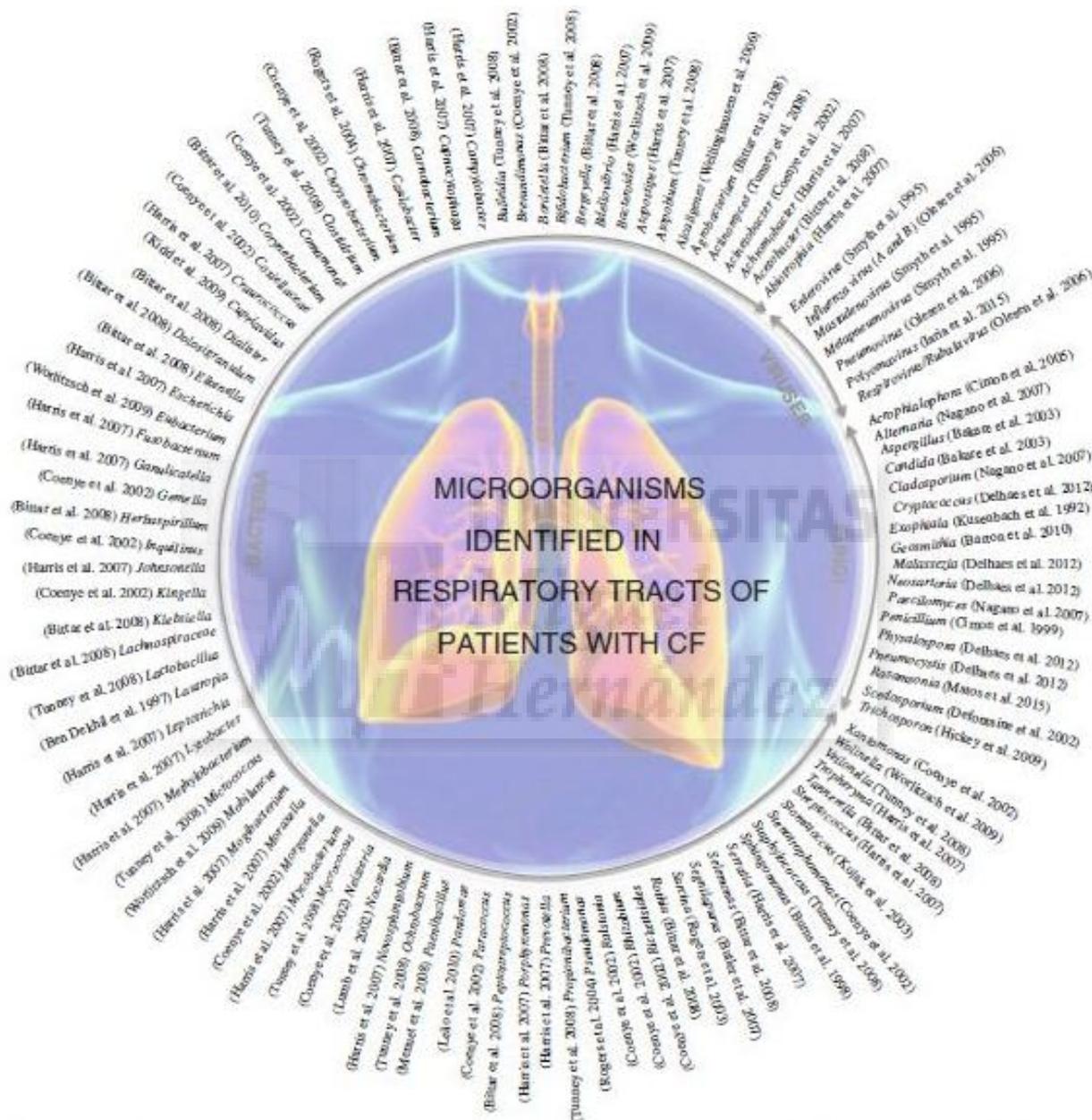


Figura 8: Género de los distintos microorganismos identificados en el microbioma de pacientes con FQ. Adaptado de Maghālaes et al(156)

1.2.4.3 Variación interindividual y núcleo del microbioma

El microbioma de los pacientes con FQ presenta una variabilidad interindividual significativa en cuanto a la estructura, composición y diversidad (157). Esta variabilidad se ha observado en pacientes con situación clínica similar (158,159) y también entre grupos de pacientes de diferente localización geográfica (160) . No obstante, independientemente de los gérmenes patógenos clásicos, existen unos géneros recuperados de forma reiterativa en varios estudios (142,157,161). Se considera que constituyen el núcleo del microbioma en pacientes con FQ, y son en orden de frecuencia absoluta y relativa:

1. *Streptococcus spp*
2. *Prevotella spp*
3. *Veillonella spp*
4. *Rothia spp*
5. *Actinomyces spp*
6. *Gemella spp*
7. *Granulicatella spp*
8. *Fusobacterium spp*
9. *Neisseria spp*
10. *Atopobium spp*

Frente al estado de conocimiento previo basado en técnicas de cultivo, destaca la abundancia de anaerobios obligados, en especial de *Prevotella*, seguido de *Actinomyces* (particularmente en adultos), *Propionibacterium*, *Veillonella* y *Atopobium*. Se ha sugerido que el daño establecido en el pulmón y vías respiratorias, favorecido por la infección crónica, puede generar zonas favorables para anaerobios oportunistas. En estudios basados en cultivo selectivo, se ha observado que la colonización por *P. aeruginosa* incrementa significativamente la probabilidad de la coexistencia con anaerobios (162,163).

1.2.4.4 Cambios evolutivos en la composición del microbioma en pacientes con fibrosis quística

Los estudios de secuenciación masiva en muestras respiratorias de FQ revelan la complejidad en la relación entre las comunidades bacterianas y también entre las comunidades bacterianas con el propio paciente (164). Se está estudiando cómo se estructuran estas comunidades (165); si su composición es relativamente estática o bien dinámica, si los cambios en el microbioma son estocásticos o bien siguen una secuencia claramente establecida y determinada por factores endógenos del huésped, la enfermedad de base o por los tratamientos recibidos. También se estudia si hay patrones de microbiota más o menos asociados con la progresión de la enfermedad pulmonar, y qué cambios se relacionan con un peor curso clínico.

No existe un modelo claramente establecido que refleje la evolución de las comunidades bacterianas en los distintos estadios evolutivos de la enfermedad. Esto se debe, en parte, al reducido número de estudios que aplican las técnicas de secuenciación masiva en pacientes con FQ, y a la heterogeneidad de los ya existentes. Numerosos estudios que realizan un análisis ecológico a través de técnicas moleculares han mostrado una disminución de la diversidad del microbioma correlacionada con la mayor edad de los pacientes y la gravedad de la situación clínica. En algunos estudios se ha apreciado que los pacientes con menor afectación pulmonar presentan microbiomas estables (160) y los que presentan enfermedad pulmonar grave manifiestan una pérdida progresiva de la diversidad de especies bacterianas (157).

1.2.4.4.a Diferencias en la composición del microbioma en las distintas localizaciones de las vías respiratorias en pacientes con FQ

Estudios transversales han mostrado diferencias en la composición del microbioma en distintas localizaciones de vía respiratoria superior (muestras obtenidas por aspirado nasal y frotis faríngeo) frente a muestras de vía respiratoria inferior (esputo inducido y sobre todo lavado broncoalveolar) (166). El microbioma nasal se caracteriza por una

comunidad polimicrobiana con altos índices de diversidad, frente a las muestras de vías inferiores, menos diversas, y dominadas por una escasa variedad de unidades taxonómicas operacionales (OTU's), sobre todo en pacientes colonizados por gérmenes clásicos, como *P. aeruginosa*. Sin embargo otros estudios no han mostrado diferencias significativas en la composición de comunidades entre muestras obtenidas por lavado broncoalveolar y frotis faríngeo (153).

1.2.4.4.b Evolución del microbioma de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística desde la edad pediátrica a edad adulta

Algunos estudios transversales muestran una alta concordancia en la composición del microbioma en fibrosis quística entre adolescentes y adultos, salvo por la presencia de *Burkholderia spp*, presente en este último grupo (166). Los autores concluyen que la composición del microbioma se establece precozmente, y se mantiene en edad adulta. Sin embargo, otros trabajos que incluyen a un mayor número de pacientes pediátricos muestran que la diversidad bacteriana es mayor en menores de 10 años que en adultos, donde se produce una meseta de la misma sobre los 25 años (157). En comparación con las comunidades de los pacientes pediátricos, el microbioma de los adultos con FQ presenta una diversidad bacteriana menor, con mayor agrupación filogenética de las comunidades (167).

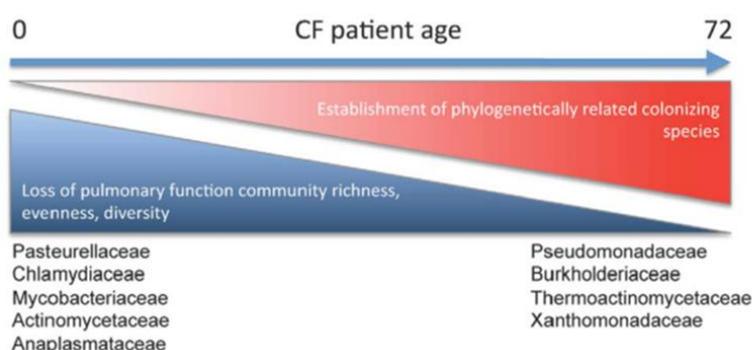


Figura 9: Evolución de la composición y diversidad de las comunidades bacterianas que componen el microbioma de las vías respiratorias en pacientes con FQ a lo largo de la edad. [Tomado de Cox et al (167)]

1.2.4.4.c Composición del microbioma en función del estado de enfermedad pulmonar

En estudios transversales realizados en grupos de pacientes con fibrosis quística con distinto grado de afectación respiratoria (157), la diversidad ecológica y la estabilidad de comunidades están potencialmente asociadas al grado de bronconeumopatía (168-170). De esta forma, la pérdida progresiva de la diversidad en el microbioma de las vías respiratorias se correlaciona con el deterioro de la función pulmonar y la aparición de especies competitivamente dominantes, como *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiae* y *Xanthomonadaceae* (166). No obstante, en otros estudios la diversidad de especies no ha demostrado constituir por sí misma un predictor de progresión de la enfermedad, ni tampoco su correlación con la gravedad de la situación clínica del paciente (114).

1.2.4.4.d Impacto sobre el microbioma de la infección/colonización por patógenos clásicos

El modelo establecido de enfermedad pulmonar en la FQ, basado en los resultados de los métodos clásicos de cultivo, pone de relevancia sólo un número limitado de gérmenes que son considerados gérmenes clásicos, como la *P. aeruginosa*. La aplicación de técnicas moleculares ha demostrado la existencia de numerosas especies de bacterias no cultivables, cuya abundancia relativa y equilibrios de dominancia pueden determinar cambios de la enfermedad pulmonar (169,171). Estudios sobre el microbioma de la FQ han mostrado que los patógenos clásicos, como *Pseudoaermona*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* y *Achromobacter* son menos prevalentes que otras especies del microbioma, pero muestran una gran tendencia a dominar sobre el resto de comunidades bacterianas cuando aparecen (157).

En relación a marcadores de enfermedad y composición del microbioma, tan sólo la presencia de *P. aeruginosa* ha mostrado correlación con la disminución de la función pulmonar, el incremento de proteína C reactiva y de elastasa neutrofílica en el esputo. Esto refuerza el papel primordial de *P. aeruginosa* en FQ (172).

1.2.4.4.e Interacción entre especies

Se han desarrollado una serie de modelos novedosos basados en el reciente conocimiento del microbioma, que tratan de complementar el esquema teórico tradicional de infección en las enfermedades pulmonares (173). Se argumenta que el ecosistema de la microbiota del pulmón tiene todas las características de un sistema adaptativo complejo: diversas especies que interactúan entre sí dentro de un espacio común, que muestran acciones interdependientes y que poseen la capacidad de adaptarse a los tratamientos recibidos y a la evolución de la enfermedad.

La infección pulmonar en la FQ involucra a diversas comunidades de especies bacterianas oportunistas que están bien adaptadas a las peculiaridades de este nicho ecológico (174). La microbiota comúnmente presente y no considerada patológica puede afectar al curso de la enfermedad. Los estudios han demostrado que una serie de especies bacterianas consideradas como flora oral normal pueden modificar el grado de virulencia mostrada por una especie como *P. aeruginosa* (51). Este patógeno puede modular la expresión de sus genes a través de la comunicación inter-especies con la microbiota del huésped (126). Al reproducir in vitro o con modelos animales las interacciones microbiológicas, se demuestra que los organismos comensales aparentemente benignos pueden favorecer la patogenicidad de *P. aeruginosa*. Esto puede explicar las exacerbaciones en pacientes con la misma carga de esta bacteria. Además, conforme progresa la enfermedad pulmonar, no sólo *P. aeruginosa*, sino otras especies que inicialmente colonizan la vía respiratoria (*Haemophilus spp*, *S. aureus*) dejan de comportarse como en pacientes sin FQ, y se convierten en cepas hipermutables, resistentes a antibióticos y de difícil erradicación (175). Este potencial efecto puede conllevar una serie de implicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Entre las distintas relaciones entre especies, se ha observado una relación inversa entre la presencia de *P. aeruginosa* y la de miembros de la familia *Pasteurellaceae*, que incluye a un patógeno precoz, *H. influenzae* (176). A su vez, se ha encontrado que las bacterias del género *Prevotella* aisladas en la microbiota respiratoria de pacientes con FQ son capaces de producir betalactamasas de espectro extendido y pueden influir en la patogénesis de la infección pulmonar crónica a través de métodos indirectos, incluyendo el

blindaje frente a ceftazidima de patógenos reconocidos, como *P. aeruginosa* (177). En otros contextos, se ha comprobado relaciones de sinergismo y antagonismo entre distintas especies bacterianas y virus en la otitis media aguda y formación de biopelículas (178), lo que podría también establecerse en las bronquiectasias de la FQ.

1.2.4.4.f Relación con mutación del CFTR

La FQ es una enfermedad monogénica autosómica recesiva determinada por la presencia de mutaciones en ambas copias del gen CFTR del individuo. En relación a la afectación pancreática, las mutaciones en el gen CFTR se han clasificado como graves (mutaciones de las clases I, II y III), con disfunción prácticamente total del CFTR, y que cursan con insuficiencia pancreática, y leves (mutaciones de las clases IV y V), con actividad residual del CFTR y muchas veces con suficiencia pancreática (9,18). *Tabla 1*

Sin embargo, no se han podido establecer asociaciones tan claras entre el genotipo y la evolución respiratoria de los pacientes con FQ. Por una parte las manifestaciones pulmonares y la mortalidad asociada a la misma es mayor en pacientes con las mutaciones de la clase I-III. Pero esta relación no es tan manifiesta como en la enfermedad pancreática, sugiriendo que otros factores pueden determinar un papel importante en la gravedad y progresión de la enfermedad pulmonar (179).

Class I	Class II	Class III	Class IV	Class V
1717-1 G->A	F508del	G551D	297 C->A	2789+5 G->A
3659delC	S945L	R560T	R117C	3849+10 kb C>T
394delTT			R347P	A455E
R553X			T 3381	3849+10 kb C-T
621+1 G->T				
E60X				
G542X				
W79R				
W1282X				

Tabla 1: Distintas clases funcionales de la mutación CFTR en relación a la suficiencia pancreática. [Tomado de: Geborek A. et al (18)]

La mutación $\Delta F508$ es la más conocida y frecuente. Se había considerado que los pacientes homocigotos $\Delta F508$ tenían generalmente manifestaciones fenotípicas más graves que los heterocigotos y que la mayoría de pacientes sin alelos $\Delta F508$ (180). No

obstante, con el mayor conocimiento de las distintas mutaciones del gen del CFTR en los últimos años, se han conocido otras formas graves pulmonares no relacionadas con la mutación $\Delta F508$, e incluso con peor pronóstico. De esta forma, pacientes portadores de dos mutaciones de clase I, presentan mayor riesgo de presentar enfermedad pulmonar grave que aquellos pacientes con al menos una mutación de clase II (18).

El distinto tipo de mutación genera unas condiciones distintas en las vías aéreas, afectando en mayor o menor medida a la composición de las secreciones y al aclaramiento de las mismas. La composición de las comunidades bacterianas puede afectarse por el microentorno desencadenado por la expresión fenotípica de las distintas mutaciones (181).

Algunos estudios exploratorios han encontrado que los pacientes portadores de al menos un alelo $\Delta F508$ presentan una composición de la microbiota más similar que los que no presentan esta mutación (176). La observación de que el tipo de mutación genera una composición diferenciada de la microbiota es un hallazgo que podría explicar, en parte, el rango de afectación pulmonar observado en varios genotipos CFTR (182) y podría tener implicaciones en la atención adaptada al paciente (167).

1.2.4.4.g Hermanos, gemelos homocigóticos, familiares y convivientes

Estudios realizados en gemelos homocigóticos con FQ han demostrado que los factores modificadores genéticos afectan significativamente a la colonización crónica por *Pseudomonas aeruginosa* y la función pulmonar, siendo más parecida la evolución en gemelos homocigotos que entre dicigóticos y otros familiares (183,184).

Otros estudios realizados en pacientes convivientes revelan que el ambiente juega también un papel determinante en la composición de la microbiota. Se ha encontrado que el microbioma de los pacientes que viven juntos es mucho más parecido que el de aquellos individuos con FQ que viven separados, no encontrado diferencias significativas entre gemelos monocigóticos y otros familiares enfermos convivientes (148). Esta observación de que el microbioma pediátrico puede ser influido por las condiciones ambientales

sugiere que las comunidades bacterianas de los pacientes con FQ son susceptibles de manipulación terapéutica.

1.2.4.4.h Exacerbaciones respiratorias

La presencia de bacterias no cultivables en la microbiota de las vías respiratorias de pacientes con FQ puede explicar exacerbaciones sin aparente crecimiento de gérmenes clásicos en los cultivos habituales, y también las diferencias en la respuesta a los tratamientos frente a los patógenos clásicos en algunos pacientes (185).

Algunos estudios han mostrado que la composición del microbioma apenas se modifica durante las fases de exacerbación, lo que sugeriría que en estas fases pueden representar una diseminación de la infección pulmonar, en lugar de un cambio en la composición de la comunidad microbiana (186). Pero hay que considerar que en las muestras de estos pacientes hay abundante cantidad de DNA bacteriano extracelular y de bacterias muertas por los antibióticos recibidos en fase de exacerbación. Los estudios que realizan procesos para seleccionar el DNA de bacterias viables muestran que la composición de las comunidades bacterianas en las vías respiratorias se altera considerablemente durante la infección, en especial en los procesos de exacerbación (187). Ciertos géneros, como *Gemella*, parecen jugar un papel importante en los cambios de composición del microbioma durante estas fases (169). La magnitud del cambio se relaciona con la diversidad y composición de la microbiota previa a la exacerbación, y suele ser transitorio. También se ha observado que el grupo del *Streptococcus milleri* puede producir infecciones crónicas y ser el patógeno más abundante en más del 30% de las exacerbaciones respiratorias (170). Otros autores no han encontrado esta relación (169).

Los nuevos trabajos proponen un modelo en el que las exacerbaciones pulmonares pueden ser accionadas por una subpoblación activa de la microbiota de pulmón, que puede representar sólo una pequeña parte de las comunidades existentes en una muestra clínica. La metodología diagnóstica debe centrarse en el objetivo final, que es el uso de los mejores métodos disponibles para proporcionar medidas cuantitativas precisas del microbioma. Esta información se podría emplear para intervenir en la toma de decisiones clínicas y proporcionar una rápida evaluación de la eficacia del tratamiento (188).

1.2.4.4.i Relación con tratamientos antimicrobianos

El tratamiento antibiótico va dirigido a *P. aeruginosa*, se trata de uno de los pilares de la asistencia a los pacientes con FQ. En distintos estados de la enfermedad (primocolonización, colonización intermitente o crónica y exacerbación) y con diversos objetivos terapéuticos, los pacientes con FQ reciben distintos tratamientos antibióticos a través de diferentes vías. Muchos de estos fármacos poseen una acción bactericida de amplio espectro, capaz de eliminar bacterias Gram positivas y Gram negativas, y de modificar la composición de la microbiota de las vías respiratorias. El tratamiento antibiótico de las exacerbaciones, normalmente consistente en dos antibióticos sistémicos con distinto mecanismo de acción, se ha asociado con una reducción del número de bacterias viables presentes en las secreciones respiratorias. Se ha planteado si el beneficio que ofrece el tratamiento antibiótico se debe no sólo a su impacto exclusivo sobre especies a las que va dirigido, sino al efecto sobre otras especies presentes en la microbiota. Entre estas bacterias se encuentra un amplio rango de especies anaerobias estrictas y anaerobias facultativas de difícil crecimiento (189).

No obstante, la antibioterapia puede tener efectos contraproducentes sobre la estabilidad en la composición del microbioma. Muchas de estas bacterias son mucho más sensibles a antibióticos que *P. aeruginosa*. Dado que la erradicación total de *P. aeruginosa* muchas veces no es factible, la disminución del número total de especies tras la antibioterapia implica un incremento de la abundancia relativa de *P. aeruginosa*, y una pérdida de la riqueza de especies (190,191).

En adultos, la microbiota de las vías respiratorias no parece afectarse a corto plazo en las exacerbaciones ni tampoco se aprecia (142) que con el tratamiento antibiótico haya una reducción significativa de la carga del DNA bacteriano. Este resultado puede verse afectado por el DNA de bacterias no viables, y sesgado por el uso de abundancia relativa en vez de abundancia absoluta. También hay que considerar que las exacerbaciones y el empeoramiento de la enfermedad puede ser desencadenado por organismos no considerados hasta la fecha como patógenos.

Los resultados de los estudios que evalúan la influencia de los antibióticos en la diversidad de las comunidades bacterianas son discrepantes. Por una parte hay trabajos que señalan un escaso impacto en la diversidad bacteriana tras el tratamiento antibiótico (192,186), y otros trabajos, que teniendo en consideración el efecto del DNA de bacterias muertas tras el tratamiento, muestran un efecto muy relevante de la antibioterapia en la composición de las comunidades bacterianas durante las exacerbaciones en FQ (193). En otros procesos infecciosos distintos a la FQ, como la neumonía asociada a ventilación mecánica por *P.aeruginosa*, también se aprecia una pérdida de diversidad bacteriana tras la administración de antibióticos (194).

1.2.4.5 Contribución del DNA de bacterias no viables en los estudios de secuenciación masiva

Además de por los tratamientos antibióticos, el retraso en el procesamiento de muestras, incluso con un intervalo de 60 minutos, puede producir la muerte de especies anaerobias que eran viables, generando un resultado falso negativo en los estudios microbiológicos (190).

El DNA de bacterias no viables en la matriz extracelular contribuye significativamente en la cantidad total de DNA bacteriano de las muestras de esputo (195). Muchas técnicas basadas en el estudio y amplificación del DNA empleadas para detectar bacterias en muestras clínicas son incapaces de discriminar entre las bacterias vivas, bacterias muertas, y el DNA extracelular. Este fracaso para limitar el análisis a las células bacterianas viables representa un problema significativo, dando lugar a resultados falsos positivos, así como la incapacidad de resolver el impacto de la terapia antimicrobiana.

Se han desarrollado diversos mecanismos para reducir significativamente la contribución de las células muertas y el DNA extracelular para este tipo de análisis de cultivo independientes. El aumento de la capacidad de resolver el impacto de la terapia antibiótica en la carga de *P. aeruginosa* en muestras respiratorias de pacientes con FQ revela cambios estadísticamente significativos, que de otra forma no se detectarían.

1.2.5 Posibles aplicaciones en la práctica clínica del estudio del microbioma en pacientes con fibrosis quística

1.2.5.1 Aplicaciones diagnósticas

La información proporcionada por estas técnicas permite entender los cambios microbiológicos subyacentes en el pulmón, la interacción del huésped con las comunidades bacterianas y el impacto de tratamientos como la terapia génica cuando sea posible (196). La flora considerada normal que está presente en pacientes con FQ, y de la que se desconocía su influencia patogénica, podría afectar el curso evolutivo de la enfermedad. Sólo recientemente los hallazgos en la composición de la microbiota de las vías respiratorias se han considerado como relevantes para el manejo de la enfermedad. Determinar el papel de estas especies, no reconocidas como patógenos clásicos, resulta fundamental.

En relación al diagnóstico, la aplicación de técnicas de secuenciación masiva facilita la identificación de un gran número de especies bacterianas y fúngicas, muchas de ellas no viables en medios de cultivo. Permite cuantificar el número de microorganismos presentes en la muestra y estudiar la diversidad de especies, ya sea dentro de la misma muestra, entre muestras de distintos nichos ecológicos del mismo individuo, además de entre muestras de diferentes sujetos. Con estas técnicas se pueden realizar comparaciones de la microbiota de pacientes en distintas situaciones clínicas, y el seguimiento evolutivo de cada paciente en función del curso clínico y los tratamientos antibióticos recibidos. También se ha demostrado que la combinación de métodos dependientes de cultivo, dirigidos por métodos de perfil molecular en pacientes con FQ, mejora la sensibilidad diagnóstica, pudiendo cultivar la mayoría de bacterias presentes en la muestra (197). Por último, la secuenciación completa del genoma bacteriano permite conocer todos los genes asociados a resistencia antibiótica, patogenicidad, virulencia y epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes (198).

1.2.5.2 Aplicaciones terapéuticas

La observación de que el microbioma en pacientes pediátricos puede ser influido por condiciones ambientales, indica que las comunidades bacterianas podrían modificarse por intervención terapéutica, en busca de un efecto deseado sobre el curso de la enfermedad (148,199). En ausencia de la capacidad de erradicar la infección crónica por agentes patológicos en fases avanzadas de enfermedad, se brinda una posible oportunidad terapéutica con la manipulación de las comunidades para favorecer a aquellas que puedan ser menos agresivas con el huésped y compitan y eliminen a otras especies más nocivas, como los patógenos clásicos (142).

En esta línea, algunos estudios longitudinales sugieren que intervenciones sobre el microbioma intestinal de lactantes y preescolares con FQ, como la lactancia materna prolongada y el uso de probióticos, pueden influir en la colonización de las vías respiratorias por *P. aeruginosa* y la aparición de exacerbaciones respiratorias (148,200,201).

Otros estudios han identificado una relación inversa entre la riqueza de la diversidad de especies bacterianas, el daño pulmonar y los marcadores inflamatorios en pacientes adultos. Tratamientos dirigidos a reducir la carga bacteriana total, manteniendo la diversidad bacteriana podrían mejorar la evolución clínica y prevenir el desarrollo de un microbioma dominado por *P. aeruginosa*, en especial las variantes mucoides y multirresistentes. También se considera que ante la posible aparición de patógenos resistentes a antibioterapia, como *P. aeruginosa*, el desarrollo de actuaciones sobre la composición bacteriana puede constituir una alternativa terapéutica (170).

Un conocimiento más completo de los microorganismos desencadenantes de los episodios de exacerbación respiratoria permitirá probablemente obtener terapias más efectivas que las actuales. Se podrá indicar una terapia antimicrobiana ante cambios del microbioma y anticiparse así a una exacerbación clínica, evitando que el paciente sufra un mayor deterioro clínico. Además, con el desarrollo de estudios longitudinales se podrá elegir antibioterapia en función de su respuesta en vivo, y no en vitro, con un mejor ajuste de la duración de los ciclos antibióticos (179).

No obstante, para hacer que el conocimiento del microbioma en FQ sea relevante en la práctica clínica habitual se necesita tener mediciones exactas de las comunidades, con procedimientos normalizados de medición de resultados, para que así, poder ser usados como guía en la terapia y guía de la eficacia del tratamiento (114). Las nuevas técnicas proporcionan una gran cantidad de información, lo que convierte todavía más en esencial, un estrecho dialogo entre los profesionales que se dedican a la ciencia básica, el diagnóstico microbiológico y la asistencia clínica (113).

1.2.6 Limitaciones de las técnicas basadas en biología molecular

La aplicación de técnicas basadas en el análisis de DNA debe tener en cuenta las posibles fuentes de DNA presentes en la muestra, tanto DNA humano como DNA bacteriano. El estudio del microbioma, requiere realizar técnicas previas para eliminar el DNA humano y el de las bacterias no viables. Si no se elimina éste, sobre todo el DNA humano, la aplicación de la secuenciación masiva en muestras de pacientes con FQ puede no documentar fielmente los cambios a corto plazo del microbioma de la vía aérea, como tras ciclos de tratamiento antibiótico, sin que sea posible monitorizar el efecto directo inmediato de un tratamiento antibiótico, si no es por el seguimiento longitudinal del número y diversidad de los organismos viables (142).

El diagnóstico de numerosas especies que no habían sido consideradas patógenas hasta la fecha introduce incertidumbres sobre si se requiere o no alguna intervención antimicrobiana sobre ellas, dado que se desconoce el papel que juegan esos organismos en la infección pulmonar (113).

En los últimos años se está incrementando el número de estudios del microbioma de los pacientes con FQ, pero presentan muchas diferencias metodológicas entre ellos: en los protocolos de extracción, regiones del 16S RNA analizadas, técnicas de secuenciación empleadas, distintos análisis informáticos... . Todo ello puede influir en el análisis de las comunidades obtenidas, y justificar diferencias en las abundancias relativas, con microorganismos infra y sobrerrepresentados. Esta heterogeneidad en los métodos de

estudio limita la capacidad de realizar comparaciones directas entre los resultados de los diversos trabajos publicados (142).

1.2.7 Limitaciones ocasionadas la validez de las muestras obtenidas por esputo

Existe controversia sobre la validez diagnóstica de las muestras empleadas habitualmente en la consulta de pacientes con FQ (frotis nasofaríngeo y esputo inducido) para el estudio del microbioma de las vías respiratorias inferiores. En algunos estudios se sugiere que se puede producir la contaminación del esputo durante la expectoración, y que los resultados obtenidos se corresponden más con una contaminación de la muestra tras su paso por la cavidad oral, que con la verdadera colonización broncopulmonar (142).

En otros estudios, los autores consideran que el esputo constituye un método adecuado para el estudio de las vías inferiores, con buena correspondencia con las muestras obtenidas por lavado broncoalveolar. Pero las vías inferiores pueden no ser uniformes con respecto a la colonización, y el esputo no ser representativo del conjunto de la vía respiratoria. Se ha demostrado heterogeneidad espacial para virus y bacterias en estudios post-mortem, con distintos tipos de nichos ecológicos (202).

1.2.8 Aspectos indeterminados, incertidumbres sobre el microbioma y enfermedad pulmonar en fibrosis quística

Pese al desarrollo del análisis metagenómico, con el estado actual de los conocimientos, no se tiene todavía una visión integral y evolutiva de la microbiota del pulmón de los pacientes con FQ, y los resultados obtenidos mediante perfiles moleculares no siempre se traducen como los que proporciona la microbiología cuantitativa tradicional. Por otra parte, estos estudios aún no han sido capaces de clarificar consistentemente la secuencia de cambios en las comunidades bacterianas, que precede a las exacerbaciones, o guiar el tratamiento antimicrobiano del paciente (188).

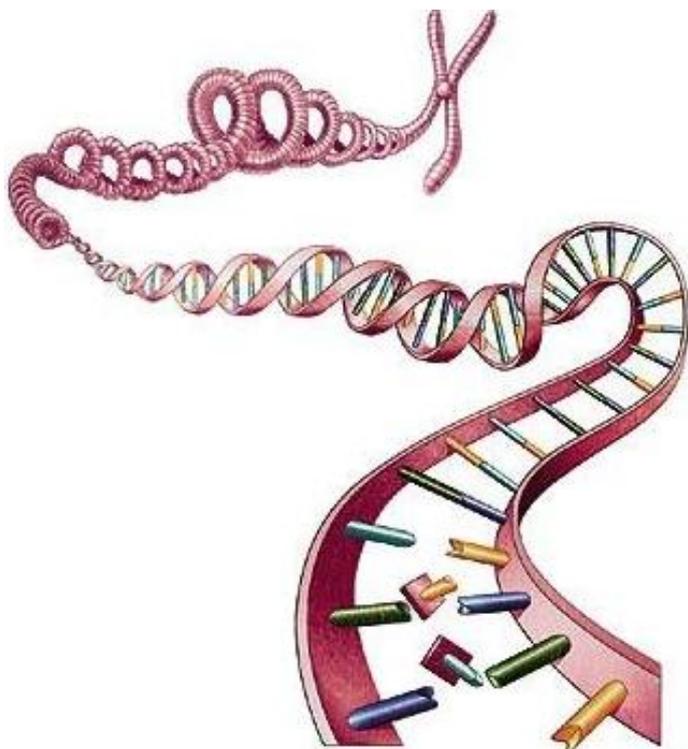
Se desconoce si los cambios en la composición y diversidad de las comunidades bacterianas que integran la microbiota de las vías respiratorias en pacientes con FQ pueden suponer un factor predisponente o protector frente a las infecciones por los gérmenes patógenos clásicos. Tampoco cómo influye la colonización o infección por *P. aeruginosa* y el resto de patógenos clásicos en la diversidad de la microbiota respiratoria de los niños con FQ. A su vez no se ha podido determinar cómo puede afectar el estado y variabilidad de la microbiota en el desarrollo de multirresistencia por parte de algunos patógenos.

No se ha determinado con exactitud el papel que juegan otros cambios en la composición, el equilibrio y la variabilidad de las comunidades bacterianas en la FQ (203). Existe incertidumbre sobre la relevancia clínica que juega la adquisición de gérmenes como las micobacterias no tuberculosas o algunos hongos oportunistas, en la evolución clínica de la enfermedad, y su relación con la microbiota en niños con FQ.

El estado actual de los conocimientos no permite establecer de forma precisa y consistente cómo influyen otros factores de la enfermedad, sobre la microbiota de pacientes con FQ: estado de la enfermedad pulmonar (patrón radiológico, estado de inflamación, función pulmonar o la necesidad de soporte respiratorio), tipo de mutación subyacente, infección o colonización por gérmenes clásicos (*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y en especial *Pseudomonas aeruginosa*), la existencia de exacerbaciones de la enfermedad, tiempo de evolución desde el diagnóstico, afectación pancreática y estado nutricional, diabetes, antecedentes de infecciones virales, fúngicas y por micobacterias, la comorbilidad con la atopia y el asma, la existencia de factores ambientales (tabaquismo, escolaridad...), antecedentes de antibioterapia sistémica e inhalada o el estado vacunal del paciente.

En parte debido al desarrollo de las nuevas técnicas de biología molecular, se viene diagnosticando un mayor número gérmenes en pacientes con FQ, muchos de ellos con significado incierto en la historia natural de la enfermedad, como micobacterias no tuberculosas, o algunos hongos oportunistas, como el *Pneumocystis jirovecii*. Se está tratando de determinar la relevancia clínica de estos aislamientos con la situación clínica del paciente, sin que se haya podido establecer su relación con los cambios en la microbiota.





JUSTIFICACIÓN



2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

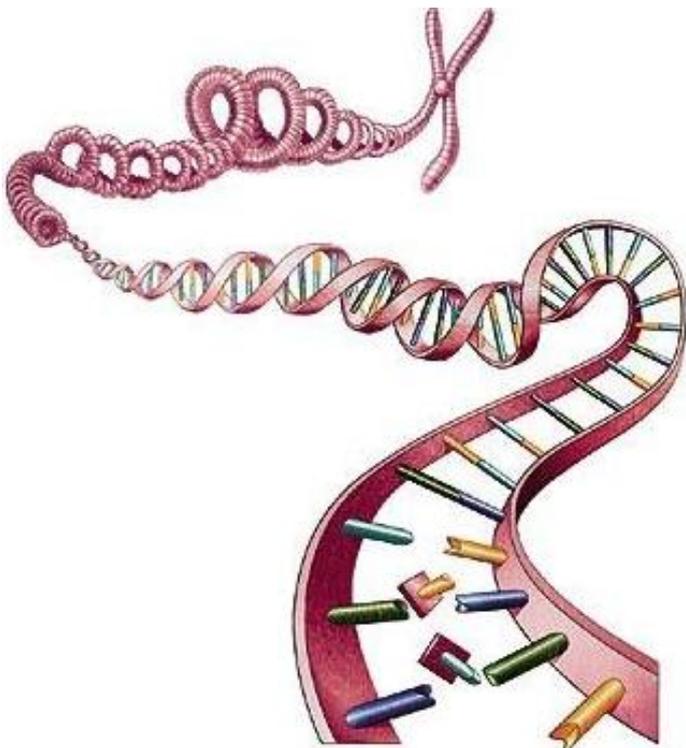
El desarrollo de las nuevas técnicas de Microbiología Molecular ha permitido aproximarse a la composición del microbioma de las vías respiratorias en pacientes con FQ. Se ha puesto de manifiesto la presencia de gérmenes no detectables por los métodos tradicionales, muchos de ellos con significado incierto en la historia natural de la enfermedad.

Debido en parte al limitado número de estudios y a la heterogeneidad metodológica y de edad de los pacientes incluidos, no se ha podido determinar de manera clara y consistente si la composición del microbioma de las vías respiratorias en pacientes pediátricos con FQ es estable y similar entre sujetos, o bien hay diferencias determinadas por variables de la enfermedad o características del huésped. Tampoco si la presencia de gérmenes clásicos o los tratamientos recibidos influyen en el número y diversidad de las comunidades bacterianas de las vías respiratorias; y en el otro sentido, si las características de la microbiota de los pacientes con FQ pueden influir en la evolución de la enfermedad, abriendo una posibilidad de intervención terapéutica.

En otros modelos ecológicos en los que se produce una pérdida del equilibrio entre especies de un ecosistema, la vulneración de una estructura comunitaria, que es favorable para el organismo o el hábitat, condiciona un enfoque adaptativo. El conocimiento minucioso de las especies que integran el ecosistema y las interacciones entre ellas, permiten a los responsables de la conservación realizar intervenciones que respondan a las nuevas condiciones cambiantes. De esta forma, disponer de un marco de referencia comprensible, de la biodiversidad evolutiva de la microbiota en pacientes con FQ, puede proporcionar a los profesionales nuevos protocolos de tratamiento más flexibles y que se adapten mejor a los pacientes durante el curso de su enfermedad.

Por este motivo, estaría justificado el desarrollo de nuevos trabajos que ayuden a determinar la composición, cambios y equilibrios de las comunidades bacterianas de las vías respiratorias en población pediátrica con FQ, y la relación con otras variables de la enfermedad, para consolidar el conocimiento global de la evolución de la microbiota respiratoria en estos pacientes.





HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis conceptual

Las características de la microbiota de las vías respiratorias en pacientes pediátricos con FQ pueden diferir en función de una serie de variables asociadas a la enfermedad, el tratamiento recibido u otras características intrínsecas del individuo.

3.1.2 Hipótesis operativa

Existen diferencias en el número absoluto, abundancia relativa y diversidad de especies bacterianas del microbioma de muestras respiratorias de niños con FQ en función de una serie de variables clínicas: edad, tipo de mutación, expresión fenotípica, función pulmonar, colonización por patógenos clásicos, tratamientos recibidos y antecedentes de exacerbación respiratoria

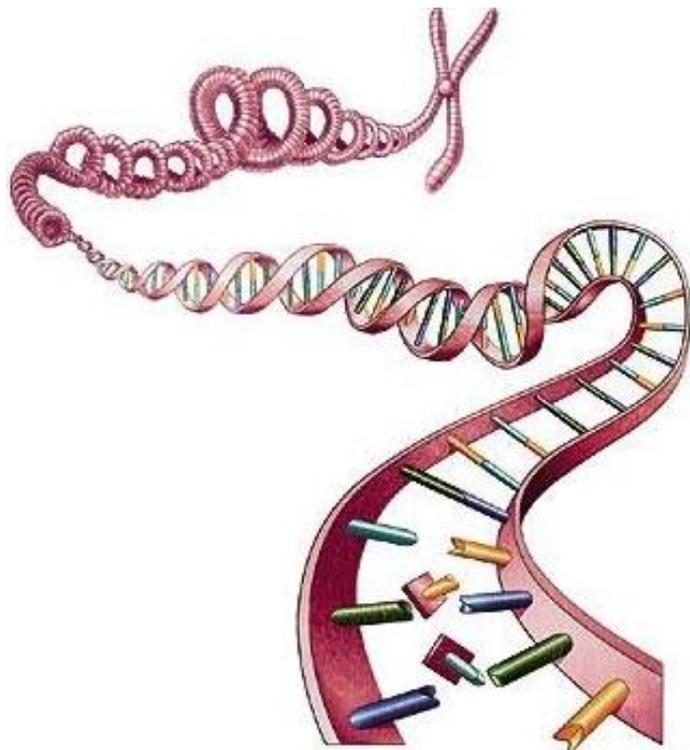
3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Describir el microbioma respiratorio en pacientes pediátricos con FQ y estudiar las diferencias en su composición entre sujetos en función de una serie de variables relacionadas con la enfermedad, comorbilidades y los tratamientos recibidos.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Describir el número absoluto de especies, su diversidad y la abundancia relativa en muestras de esputo inducido de pacientes pediátricos con FQ.
2. Comparar el número absoluto de especies, la abundancia relativa y la diversidad entre los pacientes incluidos en el estudio, determinando la relación con la edad, el tipo de mutación, la expresión fenotípica determinada por la afectación pulmonar (FEV1), estado nutricional (Z-score del IMC), colonización/infección por bacterias patógenas clásicas, tratamientos antibióticos recibidos, afectación de otros sistemas, antecedentes de exacerbaciones respiratorias y comorbilidad con otras enfermedades respiratorias (asma y alergia).
3. Diagnosticar mediante las técnicas de secuenciación masiva la presencia de micobacterias no tuberculosas en las secreciones respiratorias en pacientes con FQ. Describir la situación de la microbiota de los pacientes con la presencia o ausencia de micobacterias no tuberculosas, y el grado de afectación de las lesiones y función pulmonar.



MATERIAL Y MÉTODOS



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del Estudio

Estudio observacional transversal de la microbiota de muestras respiratorias de niños con FQ. Se analizó si la variable principal, la composición y diversidad de la microbiota bacteriana, se relacionaba con una serie de variables intrínsecas y extrínsecas de estos pacientes (**ANEXO II**).

4.2 Aspectos Éticos

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Doce de Octubre (**ANEXO I**), centro asistencial de los pacientes incluidos en el estudio. Los adultos responsables del paciente firmaron la autorización para la participación en el estudio (**ANEXO IV**), tras haber recibido información oral y escrita de las características del trabajo de investigación, así como la autorización para la cesión de muestras respiratorias anonimizadas al Biobanco del HGUA, en Colaboración con la Red Nacional de Biobancos (**ANEXO V**).

4.3 Población y Ámbito de estudio

4.3.1 Población a estudio

Menores de 16 años con FQ, que acudieron a consulta de seguimiento durante el periodo de estudio (Marzo-Abril de 2015) en los que se pudo obtener una muestra de esputo inducido.

4.3.2 Criterios de inclusión y exclusión

- Criterios de Inclusión: Pacientes en edad pediátrica (0-16 años) con diagnóstico confirmado de FQ con los criterios diagnósticos vigentes (204) (Tabla 2 y 3) que acuden a control programado a la Unidad de FQ. (Criterios European Cystic Fibrosis Society)

Tabla 2

Tabla 2	Criterios diagnósticos de la FQ (Consenso ECFS 2006)
FQ Clásica o Típica	
≥ 1 característica fenotípica +	Enfermedad sinopulmonar crónica Alteraciones digestivas y nutricionales Síndromes pierde-sal Agenesia congénita bilateral de vasos deferentes
Cl sudor ≥ 60 mmol/L	
Otras características	Generalmente 2 mutaciones identificadas Suficiencia o insuficiencia pancreática Evolución clínica variable

Tabla 3

Tabla 3	Criterios diagnósticos de la FQ (Consenso ECFS 2006)
FQ no Clásica o Atípica	
≥ 1 característica fenotípica +	Suficiencia pancreática Afectación pulmonar leve Afectación de uno o más órganos
Cl sudor "dudoso" (30-60 mmol/L) o "normal" (< 30 mmol/L) +	
2 mutaciones en el gen <i>CFTR</i> identificadas y/o PD nasal alterado	
Otras características	

PD=diferencia potencial.

- Criterios de Exclusión: rechazo a la participación en el estudio, no cumplimentación del consentimiento informado, diagnóstico no confirmado o incierto, ausencia de muestra

4.4 Centros de trabajo y competencias

- Centro de seguimiento clínico y recogida de muestra: Sección de Neumología Infantil. Unidad de Fibrosis Quística. Hospital Doce de Octubre, Madrid. Centro Acreditado por la European Respiratory Society (205).

- Centro de diagnóstico molecular: Las técnicas de Microbiología molecular fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología del HGUA y el proceso de secuenciación masiva se realizó en los laboratorios Stat vida (Portugal). Cuando se recibieron las secuencias, el análisis bioinformático fue hecho en la Unidad de bioinformática que la Sección de Microbiología del HGUA tiene en colaboración con FISABIO.

4.5 Clasificación de variables

ANEXO II

4.5.1 Variables explicativas

4.5.1.1 Intrínsecas al huésped

- Edad del paciente
- Sexo
- Número y orden de fratría.
- Presencia o ausencia de hermanos con FQ

4.5.1.2 Relacionadas con la enfermedad

Aspectos generales de la enfermedad

- 1) Genotipo
- 2) Edad al diagnóstico
- 3) Resultados del test de cloruro en sudor
- 4) Tiempo de evolución de síntomas previo al diagnóstico
- 5) Sintomatología principal en el momento del diagnóstico

Relativas a la enfermedad pulmonar

- 1) Porcentaje sobre el valor teórico del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1)
- 2) Presencia de lesiones radiológicas: infiltrados, atelectasias, bronquiectasias, abscesos, enfisema
- 3) Necesidad de oxigenoterapia (intermitente o continua)
- 4) Necesidad de soporte ventilatorio (intermitente o continuo)
- 5) Antecedentes de exacerbaciones respiratorias
- 6) Antecedentes de exacerbaciones en los últimos 3 meses

- 7) Si se ha realizado lavado broncoalveolar: edad en su realización y resultados microbiológicos
- 8) Antecedentes del Neumotórax/Hemoptisis
- 9) Antecedentes de aspergilosis broncopulmonar alérgica
- 10) Comorbilidad alergia/asma/dermatitis atópica

Relativas a la enfermedad sobre otros aparatos en el momento de recogida de las muestras

1. Estado nutricional. Z-score del índice de masa corporal (IMC). Se obtiene mediante la siguiente fórmula(206):

Z-score: $(\text{IMC paciente} - \text{p50 IMC}) / \text{desviación estándar}$

2. Insuficiencia pancreática (Recibe tratamiento con enzimas pancreáticas o Van de Kamer positivo)
3. Diabetes mellitus
4. Afectación hepática
5. Afectación de senos
6. Alteraciones electrolíticas
7. Otros órganos afectados

4.5.1.3 Resultados microbiológicos previos (sobre muestras respiratorias)

1. Portador o no en el momento del estudio o antecedentes de colonización/infección por *Haemophilus spp.* En qué muestra. Criterios de portador crónico o antecedentes de intento de erradicación.
2. Portador o no en el momento del estudio o antecedentes de colonización/infección por *Staphylococcus aureus*. En qué muestra. SAMR ó SAMS. Criterios de portador crónico o antecedentes de intento de erradicación.

3. Portador o no en el momento del estudio o antecedentes de colonización/infección por *Pseudomonas aeruginosa*. En qué muestra. Criterios de portador crónico o antecedentes de intento de erradicación.
4. Portador o no en el momento del estudio o antecedentes de colonización/infección por *Burkholderia cepacia*. En qué muestra. Criterios de portador crónico o antecedentes de intento de erradicación.
5. Portador o no en el momento del estudio o antecedentes de colonización/infección por *Stenotrophomonas maltophilia*. En qué muestra. Criterios de portador crónico o antecedentes de intento de erradicación.
6. Portador o no en el momento del estudio o antecedentes de colonización/infección por *Achromobacter xylooxidans*. En qué muestra. Criterios de portador crónico o antecedentes de intento de erradicación.
7. Portador crónico o no de otras bacterias. En qué muestras. Criterios de portador crónico o antecedentes de intento de erradicación.
8. Portador o no en el momento del estudio o antecedentes de colonización/infección por micobacterias ambientales.
9. Portador o no en el momento del estudio o antecedentes de colonización/infección por *Pneumocystis jirovecii*.
10. Portador o no en el momento del estudio o antecedentes de colonización/infección por otros hongos.
11. Aislamiento de algún otro germen en los últimos 6 meses: qué germen, qué muestra.

4.5.1.4 Aspectos Terapéuticos

1. Antecedentes de tratamiento con antibiótico sistémico (excluido macrólidos intermitentes) en los 3 meses previos a la realización del estudio: principio activo y vía de administración
2. Tratamiento antibiótico nebulizado en el momento del estudio: principio activo.
3. Tratamiento con macrólidos orales intermitentes en el momento del estudio.
4. Antecedentes de tratamiento corticoideo sistémico en el mes previo al estudio.
5. Tratamiento con corticoides inhalados en el momento del estudio
6. Tratamiento con dornasa alfa (DNAse) en el momento del estudio
7. Tratamiento con salbutamol en el momento del estudio
8. Tratamiento con inhibidor bomba de protones en el momento del estudio

4.5.2 Captación y recogida de datos

La información fue obtenida por la neumóloga infantil responsable de la asistencia del paciente en la consulta semanal de fibrosis quística del Hospital Doce de Octubre. Las fuentes de información fueron la propia historia clínica y los registros disponibles en la Unidad de Fibrosis Quística de este hospital.

4.5.3 Cuestionario para la recogida de variables explicativas

Se diseñó un formulario consensuado con los centros de trabajo para la recogida las variables explicativas estudiadas (**ANEXO III**). Se realizó un proceso codificación de las muestras con 6 dígitos para mantener anonimato:

. Primeros 2 dígitos: Centro de recogida (Se codificó al Hospital Doce de Octubre como 01)

. Segundos 2 dígitos: orden numérico de estudio del paciente

. Últimos 2 dígitos:

01	Muestra de esputo inducido
02	Muestra de aspirado nasofaríngeo
03	Muestra de LBA

4.5.4 Variables Resultado: Microbiota de las vías respiratorias de los pacientes

4.5.4.1 Composición del Microbioma

El análisis de la composición y características de las comunidades bacterianas se llevó a cabo a través de:

- Identificación de cada especie o unidad taxonómica operativa (OTU).
- Cuantificación del número absoluto de cada una de las especies de la muestra.
- Cuantificación de la abundancia relativa de cada una de las especies, expresado por el porcentaje de dicha especie sobre el resto.
- Género dominante: Se empleó la definición establecida por Coburn et al (157), correspondiente al género más abundante en una muestra, y que al menos duplique en frecuencia al segundo género más frecuente. No todas las muestras presentarán género dominante.

- Composición filogenética característica del microbioma de los pacientes (Microbioma core). Se establece con aquellos géneros que presentan una abundancia relativa >1% de las secuencias y están presentes en más del 50% de las muestras de los pacientes. Esta definición arbitraria establecida por Coburn et al (157) permite la comparación entre grupo homogéneos.

4.5.4.2 Análisis de la diversidad de especies bacterianas

A la hora de realizar estudios de biodiversidad, en varios entornos, se han desarrollado parámetros para caracterizarla como una propiedad de las comunidades ecológicas, incluida la microbiota bacteriana en los órganos y sistemas del ser humano. Las especies no están aisladas en un entorno neutro; en cada nicho ecológico se encuentra un número variable de comunidades que interactúan entre ellas y con el entorno de las vías respiratorias. Por ello, para comprender los cambios de la biodiversidad con relación a la estructura del medio donde se desarrollan, la separación de los componentes alfa, beta y gamma puede ser de gran utilidad (207).

4.5.4.2.a Alfa Diversidad

La diversidad alfa es la riqueza de especies de una comunidad particular a la que consideramos homogénea (208). Se pueden emplear métodos basados en la cuantificación del número de especies presentes (riqueza específica), o también en función de la estructura de la comunidad (209), es decir, la distribución proporcional del valor de importancia de cada especie, expresado por ejemplo como abundancia relativa (157). Los métodos basados en la estructura pueden a su vez clasificarse según se basen en la dominancia (índice de Simpson, Serie de Hill) o en la equidad de la comunidad, como en el índice de Shannon-Wiener, uno de los más empleados en los estudios de microbioma humano. Este índice se representa normalmente como H' y se expresa con un número positivo.

La fórmula del **índice de Shannon** es la siguiente:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

donde:

S – número de especies (la riqueza de especies)

P_i – proporción de individuos de la especie “i”, respecto al total de individuos (es decir la abundancia relativa de la especie “i”):

n_i – número de individuos de la especie “i”

$$\frac{n_i}{N}$$

N – número total de individuos de todas las especies

De esta forma, el índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (abundancia). Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y el logaritmo de S , cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos.

4.5.4.2.b Beta Diversidad

La diversidad beta es el grado de diferencia en la composición de especies entre distintos hábitats, comunidades o individuos, también definida como el cambio biótico a través de gradientes ambientales (207). A diferencia de las diversidades alfa y gamma que pueden ser medidas en función del número de especies, la beta diversidad se basa en proporciones o diferencias. Se mide a través de la abundancia de composición o disimilitud mediante la distancia de Bray-Curtis (entre 0 y 1: 0 es la misma composición entre todas las especies y 1 es que no comparten ninguna especie), y se puede representar a través del análisis de los componentes principales.

El *análisis de componentes principales* (ACP) es una técnica estadística multivariante de síntesis de la información o reducción de la dimensión (número de variables), que permite encontrar los factores subyacentes que mejor explican, tras un conjunto de datos, la variabilidad de éstos.

4.6 Recogida y Procesamiento de muestras

La muestra de esputo inducido con suero salino hipertónico al 7% se obtuvo durante la revisión programada en consulta en la Unidad de FQ del Hospital Doce de Octubre. Se congeló en la primera hora tras su obtención a -20°C, hasta su traslado al centro de diagnóstico molecular. Una vez recibido en este centro, el esputo se homogeneizó con N-acetil cisteína y se dividió en dos partes, una para el estudio y otra para almacén en el Biobanco.

4.6.1 Extracción y purificación del DNA bacteriano

La extracción de ácidos nucleicos se realizó mediante el sistema comercializado por Molzym: MolYsis™.

MolYsis constituye una herramienta pre-analítica de degradación diferencial de ácidos nucleicos para la detección molecular de bacteriemia y otras infecciones. Consiste en un sistema que permite aislar el DNA bacteriano de muestras clínicas humanas. Realiza una lisis selectiva de las células humanas y degrada el DNA humano, por lo que aumenta la sensibilidad y especificidad en el estudio de DNA bacteriano de dichas muestras. El kit MolYsis Basic5 de Molzym usa tiocianato de guanidinio y una DNAsa resistente a un medio caotrópico específico para lisar células humanas y eliminar sus ácidos nucleicos antes de la lisis de células bacterianas y la extracción de ácido nucleico.

4.6.2 Amplificación del DNA bacteriano

La etapa de enriquecimiento del DNA, metodología muy eficiente como paso previo a la secuenciación, se ha llevado a cabo mediante el empleo de una técnica alternativa a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), **la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA)**. Se trata de una técnica de amplificación isoterma para enriquecer el DNA bacteriano, es decir, aumentar su concentración en cada muestra.

En el área de la amplificación de DNA está ganando terreno la MDA, en detrimento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dado que esta última depende de un conocimiento previo de las secuencias a amplificar, y genera amplicones relativamente pequeños. La MDA es una metodología inespecífica que permite la amplificación eficiente y representativa de genomas completos, análisis genómicos que dependen no solo de la longitud del material amplificado, sino también de una amplificación homogénea. MDA amplifica todo el genoma bacteriano, es decir, no usa unos primers específicos para amplificar sólo secuencias del 16S.

La reacción MDA, descrita por Dean et al. (210), se basa en el empleo de oligonucleótidos hexaméricos de secuencia al azar que hibridan en distintas regiones del genoma a amplificar y que son extendidos posteriormente por la DNA polimerasa (enzima que sintetiza DNA) del bacterifago Ø29, en una reacción isotérmica a 30 °C, sin que se requieran ciclos de desnaturalización/renaturalización (a diferencia de la PCR), ni de un conocimiento previo de la secuencia a amplificar. Esto da lugar a una estructura ramificada de cadena sencilla a la que pueden unirse nuevos hexámeros que son el molde de la reacción de amplificación de DNA (*Figura 10*).

El éxito de MDA radica en las características intrínsecas y específicas de la DNA polimerasa de Ø29:

- 1) Capacidad de polimerizar más de 100.000 nucleótidos (las unidades que se ensamblan para construir el DNA) sin disociarse del DNA.
- 2) Capacidad de atravesar regiones de doble cadena ya que el enzima acopla la síntesis del DNA a la apertura (desnaturalización) de las dos cadenas del DNA, haciendo innecesarios ciclos térmicos de desnaturalización.
- 3) Elevada fidelidad de síntesis del DNA (sólo un error cada 10^8 - 10^9 nucleótidos incorporados).

Diversos estudios han demostrado que la MDA es un método muy sensible, capaz de amplificar material genético a partir de una única célula (211). La MDA, al ser capaz de amplificar todo el DNA presente en la muestra y en combinación con la degradación

selectiva del DNA por el método Molysis es un procedimiento eficiente para analizar el microbioma bacteriano de una muestra biológica.

La MDA se emplea fundamentalmente para realizar ampliaciones del genoma completo (WGA) en secuenciación y análisis de mutaciones (212,213).

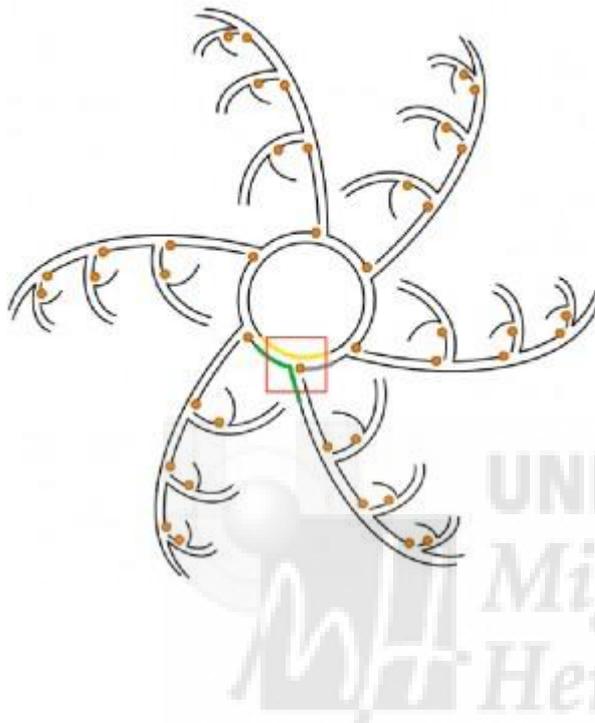


Figura 10:

Amplificación por desplazamiento múltiple con la DNA polimerasa de $\phi 29$. La DNA polimerasa (en esferas naranjas) puede comenzar simultáneamente la síntesis del DNA en múltiples sitios a los que se han hibridado al azar los hexámeros. Una vez alcanzado el hexámero que se encuentra delante, la síntesis continúa ya que la polimerasa abre esa región de cadena doble, dando lugar a "ramas" de cadena sencilla a las cuales se unirán nuevos hexámeros. Esta síntesis continua del DNA dará lugar a una amplificación isotérmica y exponencial del DNA.

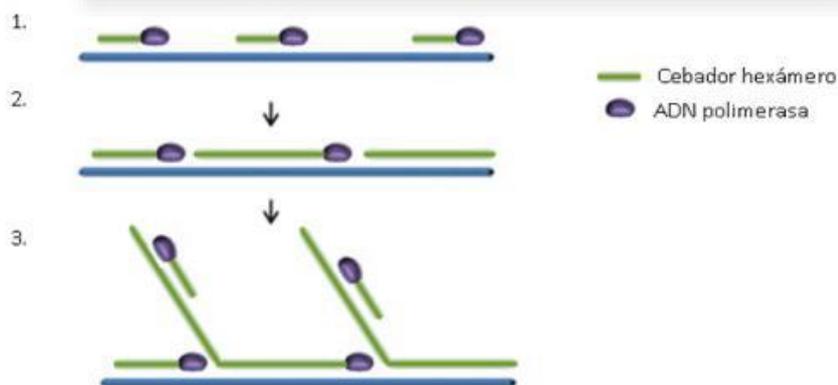


Figura 11: Esquema de amplificación mediante MDA.

4.6.3 Secuenciación masiva y filtrado por calidad de secuencias

La secuenciación masiva del DNA se realizó mediante el sistema **Illumina** MiSeq con 250bp pair-ends. La elección de este método sobre los demás sistemas de secuenciación de nueva generación (NGS) fue por su capacidad de generar millones de lecturas de una sola vez, lo que aumenta la probabilidad de obtener secuencias suficientes para poder completar los genomas bacterianos presentes en cada muestra de esputo.

El filtrado de calidad de las secuencias nos lo proporcionó el programa bioinformático Pyronoise.

4.6.4 Ensamblaje de genomas bacterianos y obtención de secuencias 16S

El ensamble de fragmentos es una ardua tarea, realizada mediante técnicas computacionales de elevadas prestaciones. El montaje de los genomas bacterianos de cada muestra se obtienen según la cobertura de la secuenciación. El objetivo es reconstruir la cadena que representa el código genético de la molécula original a partir de los millones de lecturas obtenidas mediante Illumina.

De todas las secuencias que se obtuvieron por secuenciación masiva, se seleccionaron las lecturas referentes al gen 16srRNA usando los programas *ssu-align* y *meta-rna*.

Las secuencias se separaron en base a los adaptadores genéticos A y B para determinar la muestra a la que pertenecían. Con este archivo de secuencias, donde solo están las secuencias del 16S, éstas se compararon mediante BLAST con las bases de datos **GreenGenes** (DeSantis et al. 2006) y **RDP** (Cole et al. 2008), bajando hasta el nivel de familia, donde nuestras propias simulaciones establecen que con una longitud de 400 pb, la fiabilidad en la adscripción taxonómica es superior al 95%, y de género, donde la fiabilidad es superior al 90%.

4.6.5 Análisis de datos de secuenciación. Bioinformática

El filtrado de calidad de las secuencias se realizó con el programa Pyronoise®, y la comparación de las muestras entre sí se realizó mediante el programa Unifrac, especialmente desarrollado por el Consorcio del Microbioma Humano para análisis de genes ribosomales de microorganismos procedentes de tejidos humanos.

Con las asignaciones de los taxones bacterianos de cada muestra y mediante el programa QIIME v18.0 se determinó la abundancia absoluta y relativa de especies, la dominancia y la composición de las comunidades bacterianas de las muestras obtenidas, el estudio de diversidad de especies en cada muestra (alfa diversidad) a través del índice de Shannon Wiener y la diversidad entre muestras (beta diversidad), empleando la distancia de Bray-Curtis y el análisis de componentes principales.

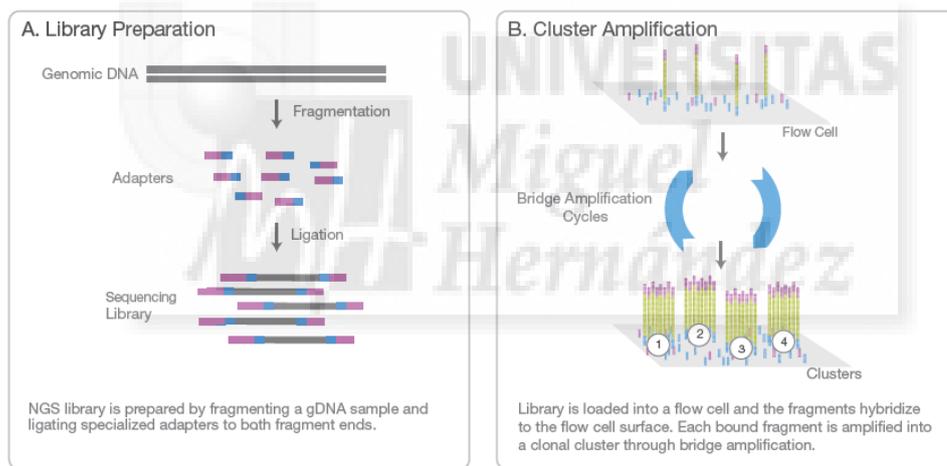
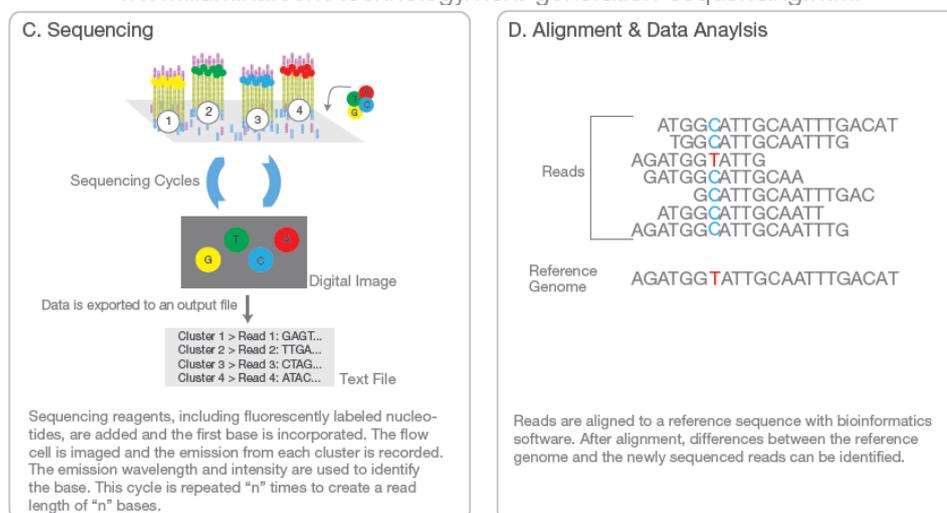


Figura 12

www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html



4.6.5 Conservación posterior de muestras

Una vez extraído el DNA, el resto de muestras respiratorias se depositó en el Biobanco del Hospital General Universitario de Alicante para posibles estudios posteriores (comparativos o de seguimiento de estos pacientes, desarrollo de nueva tecnología que permita ampliar el estudio...). Para ello los responsables del paciente cumplimentaron y firmaron el consentimiento para la conservación de muestras de la Red Nacional de Biobancos (**ANEXO V**).

4.7 Análisis Estadístico

Se calculó la alfa diversidad y la beta diversidad de las muestras mediante un análisis bioinformático usando QIIME v18.0 software para filtrar la calidad y el tamaño de las secuencias obtenidas mediante el sistema Illumina. Sólo las secuencias con tamaño comprendido entre 250 bp y 500 bp con un end-trimming quality mayor de 25 se analizaron e incluyeron en el estudio.

La Operational Taxonomic Units (OTU'S) se asignó utilizando RDP database (Ribosomal Database Project) para el gen 16S rRNA.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 22.0 para Windows (SPSS Inc., 2013). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos para valores de p menores de 0,05.

4.8 Procedimiento Estadístico

4.8.1 Estadística Descriptiva

En el apartado correspondiente a la estadística descriptiva, de cada una de las variables explicativas se calculó la distribución de frecuencias en las variables categóricas, y de las variables continuas su aproximación a la distribución normal, valores máximos y

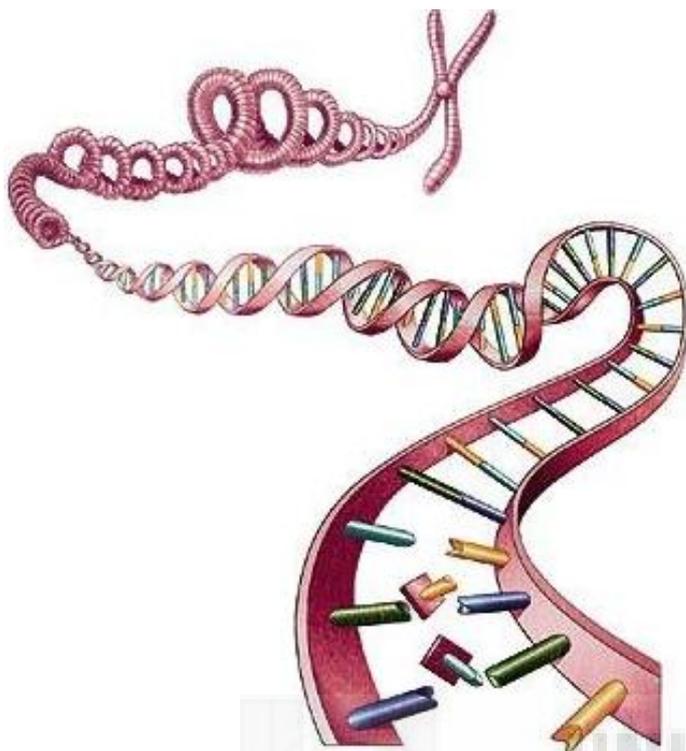
mínimos, estadísticos de tendencia central y dispersión (medias, mediana y desviación típica).

4.8.2 Análisis Univariante

Finalmente se realizó un proceso de análisis estadístico entre las variantes clínicas y los distintos índices de diversidad bacteriana. Después de este análisis bioinformático, se compararon los datos usando las pruebas de ANOVA y G-test de independencia. También se analizó la β -diversidad mediante el análisis de componentes principales PcoA. El análisis de α -diversidad se realizó mediante el cálculo de las curvas de rarefacción y el índice de Shannon usando el software informático R v 2.15.2 (<http://R-project.org>).

Se realizó un estudio de análisis estratificado entre aquellas variables explicativas que pudieran actuar como posibles variables de confusión.





RESULTADOS



5. RESULTADOS

5.1 Variables explicativas

Se seleccionaron 13 muestras correspondientes a 13 pacientes con los criterios de inclusión, cuyos familiares dieron su consentimiento para participar en el estudio.

5.1.1 Características demográficas de los pacientes

La edad media de los pacientes incluidos fue de 12,9 años, con un rango de edad de 7 a 17,2 años. Se incluyeron en el estudio 7 mujeres (53,8%) y 6 varones (46,2%). 7 de los pacientes (54,7% del total) eran hermanos únicos. 5 de los pacientes (38,5% del total) tenían otro hermano, y en 1 caso (7,7% del total) el número total de hermanos era de 3. En relación al orden de fratría, 1 de los pacientes estudiados era un segundo hermano, y otro el tercero. De los 6 pacientes que tenían hermanos, en 4 casos los hermanos estaban libres de enfermedad. 2 pacientes incluidos (nº 12 y 13) eran hermanos (y no tenían más hermanos). Los valores de estas variables se muestran en la *Tabla 4*.

5.1.2 Características relacionadas con la fibrosis quística y la evolución de la enfermedad

La edad media al diagnóstico fue de 17,3 meses (rango de 0 a 99 meses), con una desviación estándar de 28,6 meses. 4 pacientes (30,76% del total) fueron diagnosticados en período neonatal por sintomatología digestiva (íleo meconial). Ninguno de los pacientes fue diagnosticado mediante sistemas de cribado neonatal, vigente en la Comunidad de Madrid desde el año 2009.

El valor medio de la determinación de cloruro en el sudor de los 13 pacientes en el momento del diagnóstico fue de 103,3 mEq/L (rango: 96-117 mEq/L; desviación estándar: 6,9 mEq/L). El síntoma principal en el momento del diagnóstico correspondía a patología gastrointestinal en 7 casos (53,9% del total). Como se ha referido anteriormente, 2 fueron diagnosticados en el período neonatal por padecer un íleo meconial. En 4 pacientes (30,8%) los síntomas principales fueron respiratorios, y en 1 caso una deshidratación hiponatémica. 1 de los casos permanecía asintomático, y fue diagnosticado tras el nacimiento, por el antecedente de su hermano enfermo. Los valores de estas variables se detallan en la *Tabla 4*.

Tabla 4 : Características sociodemográficas de los pacientes incluidos en el estudio, edad al diagnóstico y síntoma inicial que conllevó al diagnóstico

Variables Intrínsecas de la enfermedad, datos generales	Media \pmSD (rango) o n(%)
Número de pacientes	13
Edad (en años)	12,9 \pm 3,0 (7-17,2)
Mujer/varón	7 / 6
Hermanos enfermos de FQ <ul style="list-style-type: none"> • Hijos únicos • Con todos sus hermanos libres de FQ • Con hermanos afectados de FQ 	7 (54,7) 4 (30,7) 2 (15,4)
Edad (meses) al diagnóstico de la enfermedad	17,3 \pm 28,6 (0-99 meses)
Pacientes diagnosticados en periodo neonatal	4 (30,7)
Signo/síntoma guía predominante en el momento del diagnóstico <ul style="list-style-type: none"> • Íleo meconial • Otra patología digestiva • Respiratorio • Deshidratación hiponatémica • Historia familiar 	2 (15,1) 5 (38,5) 4 (30,8) 1 (7,7) 1 (7,7)

Se conocía la mutación completa del CFTR en la totalidad de pacientes incluidos en el estudio. 3 pacientes (23,1% del total) eran homocigotos para la mutación Delta F508. Otros 6 pacientes, heterocigotos (46,15% del total), poseían esta mutación. 3 pacientes (23,1% del total) eran homocigotos para la mutación H609R/H609R, 2 de ellos hermanos. La distribución de frecuencias de las mutaciones encontradas se exponen en la *Tabla 5*.

Tabla 5: Prevalencia de las mutaciones del gen CFTR de los pacientes incluidos en el estudio. Se expone la clase de cada una de los alelos de las mutaciones de los pacientes (214), así la correspondencia con la gravedad del fenotipo según el tipo de mutación (en relación con la insuficiencia pancreática)

Nd=no determinado

Genotipo	Tipo de mutación de cada alelo de los pacientes	Manifestación clínica según genotipo	N (%)
Delta F508 homocigoto	II/II	Alto Riesgo(18)	3 (23,1)
Delta F508/w1089x=2	II/nd	Alto Riesgo (18)	1 (7,7)
Delta F508/3120+1g	II/I	Alto Riesgo(216)	1 (7,7)
Delta F508=(18)3AA>6	II/I	Alto Riesgo(217)	1 (7,7)
DeltaF508/H199Y	II/nd	Alto Riesgo(204)	1 (7,7)
Delta F508/6542X	II/I	Alto Riesgo(18)	1 (7,7)
DeltaF508/CFTR del 17a-18	II/nd	Alto Riesgo(204)	1 (7,7)
H609R/H609R	nd/nd	Alto Riesgo(218)	3 (23,1)
3120+16>A/3120+16	I/I	Alto Riesgo(216)	1 (7,7)

En el momento de la recogida de la muestra, la totalidad de los pacientes presentaba criterios de insuficiencia pancreática, 7 (53,8%) afectación hepática, 3 (23,1%) afectación de senos paranasales, y 1 de los pacientes (7,7%) presentaba diabetes relacionada con FQ. El valor medio de la puntuación Z score para el p50 de índice de masa corporal (IMC) fue de $-0,85 \pm 0,72$ (-1,70-0,50). Los datos recogidos de patología extrapulmonar se exponen en la Tabla 6.

Desde el punto de vista de la afectación respiratoria, en los 13 casos se pudo recoger el FEV1. El valor medio obtenido de porcentaje con respecto al teórico para edad, talla y sexo fue de un 65,23% (rango: 32-108%; desviación estándar: 22,01%). 2 pacientes (15,4%) requerían oxígeno suplementario de forma intermitente. Ninguno de los pacientes requería soporte ventilatorio continuo o intermitente. 9 de los pacientes (69,2% del total) tenía historia previa de exacerbaciones respiratorias. En 8 casos (61,5%) se había producido al menos una exacerbación durante los 6 meses previos al estudio. La totalidad de los pacientes presentaban imágenes radiológicas compatibles con bronquiectasias. De los pacientes estudiados, 6 (46,2%) presentaban atelectasias, 4 (30,8%) infiltrados, y 3 (23,1%) un patrón radiológico de enfisema pulmonar. De los pacientes, 4 (30,8% del total) tenían sensibilización a alérgenos, 2 (15,4%) asma, y 1 (7,7%) dermatitis atópica. Un paciente (7,7%

del total) tenía antecedente de aspergilosis broncopulmonar alérgica. Los datos detallados de patología broncopulmonar y comorbilidades respiratorias se exponen en la *Tabla 6*.

Tabla 6: Prevalencia de la patología extrapulmonar, valor medio de Z-score del índice de masa corporal y datos de la enfermedad broncopulmonar de los pacientes incluidos, expresados con el valor medio de la fracción del volumen espirado en el primer segundo (FEV1), necesidad de oxigenoterapia, afectación pulmonar radiológica y comorbilidades con otras enfermedades respiratorias independientes de la FQ

Afectación Extrapulmonar	Media±SD (rango) o n(%)
<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia pancreática • Afectación hepática • Diabetes relacionada FQ • Afectación sinusal 	<p>13 (100)</p> <p>3 (23,1)</p> <p>1 (7,7)</p> <p>1 (7,7)</p>
Estado Nutricional	
IMC Z score	-0,85±0,72 (-1,70-0,50)
Afectación broncopulmonar	
FEV1, % predicho	65,23% ± 22,0 (32-108%)
Oxigenoterapia intermitente	2 (14,5)
Historia previa de exacerbaciones en los últimos 6 meses	8 (61,5)
Afectación radiológica	
<ul style="list-style-type: none"> • Bronquiectasias • Atelectasias • Infiltrados • Patrón enfisematoso 	<p>13 (100)</p> <p>6 (46,2)</p> <p>4 (30,8)</p> <p>3 (23,1)</p>
Comorbilidad	
<ul style="list-style-type: none"> • Alergia • Asma • Dermatitis atópica • Aspergilosis broncopulmonar alérgica 	<p>4 (30,8)</p> <p>2(15,8)</p> <p>1 (7,7)</p> <p>1 (7,7)</p>

En relación a la evolución microbiológica de los pacientes por los cultivos previos (*Tabla 7*), ninguno de los pacientes constaba como portador de *H. influenzae* en el momento del estudio. De los 13 pacientes incluidos, 12 (92,3%) eran portadores de *S. aureus*. De estos 12, 1 era resistente a metilicina (7,7% del total). 1 paciente (7,7%) no estaba colonizado, ni presentaba antecedentes de colonización. En 7 de los 12 casos de portadores de *S. aureus* hubo un intento de erradicación previo.

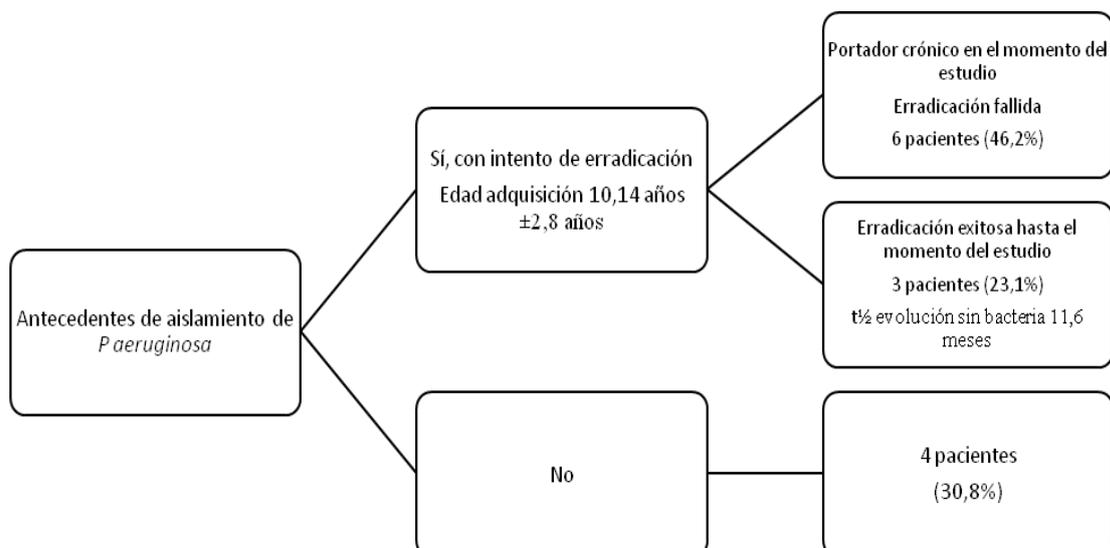
El 46,2% (6 pacientes) estaba colonizado en el momento del estudio por *P. aeruginosa* (Tabla 7 y Figura 13). 7 pacientes (46,2%) no estaban colonizados. De estos 7 pacientes libres de *Pseudomonas spp*, 3 (23,1% del total) habían sido previamente colonizados y se consiguió su erradicación. La edad media de adquisición de *P. aeruginosa* en los colonizados y en los que se había conseguido la erradicación fue de 10,14 años \pm 2,8 años. Entre el diagnóstico de primoinfección de *P. aeruginosa* y la erradicación del germen en los 3 casos que se consiguió transcurrió una media de 11,6 meses. El tiempo medio transcurrido desde la erradicación hasta el momento del estudio en los 3 casos erradicados fue de 16,6 meses.

En relación a otros gérmenes, ningún paciente participante en el estudio era portador o tenía antecedente de infección o colonización por *B. cepacia*. 1 paciente (7,7% del total) era portador de *S. maltophilia*, sin que se hubiera realizado intento previo de erradicación. La edad de adquisición del germen fue 10,08 años (23 meses de evolución hasta el momento del estudio). Ningún paciente participante en el estudio era portador de *A. xylooxidans*. 1 paciente (7,7% del total) era portador de *S. marcescens*, y en otro (7,7% del total) se había detectado en el esputo *E. coli* y *P. mirabilis*. 1 paciente (7,7% del total) tenía antecedentes de aislamiento de hongos, no especificado. Ningún paciente tenía antecedentes de aislamiento de micobacterias no tuberculosas en los estudios previos.

Tabla 7: Antecedentes microbiológicos de infección o colonización por distintos gérmenes en los pacientes del estudio

Antecedentes microbiológicos previos al estudio de los pacientes	Número absoluto (%)
Portador crónico <i>S. aureus</i> meticilin sensible	11 (84,6)
Portador crónico <i>S. aureus</i> meticilin resistente	1 (7,7)
Antecedente de intento fallido erradicación	7 (53,8)
Sin antecedente de infección/colonización de <i>S. aureus</i>	1 (7,7)
<i>P. aeruginosa</i>	
Portador	6 (46,2)
No portador, con antecedente de erradicación	3 (23,1)
Edad media en meses de primoinfección <i>P aeruginosa</i>	10,14 años (\pm 2,8)
Otros aislamientos	
<i>S. maltophilia</i>	1 (7,7)
<i>E. coli</i> y <i>P. mirabilis</i>	1 (7,7)
<i>S. marcescens</i>	1 (7,7)

Figura 13: Antecedentes de infección, colonización o erradicación por *P. aeruginosa* en los pacientes incluidos en el estudio



5.1.3 Aspectos terapéuticos

Los principales aspectos terapéuticos están recogidos en la *Tabla 8*. Ningún paciente había recibido antibióticos sistémicos en el mes previo al estudio. 10 de los pacientes (76,9%) estaba recibiendo antibioterapia nebulizada: 7 pacientes (53,8% del total) estaban recibiendo tratamiento con colistina nebulizada en el momento del estudio, 1 paciente (7,7% del total) con tobramicina nebulizada y 2 (15,4%) con aztreonam y colistina nebulizados. En momento del estudio, 10 pacientes (76,9%) estaban recibiendo tratamiento con macrólidos de forma intermitente. Ningún paciente había recibido tratamiento con corticoides orales en el mes anterior a la recogida de la muestra, y 2 pacientes (15,4%) estaban recibiendo corticoides inhalados en el momento del estudio. El 69,2% (9 casos) de los pacientes estaba recibiendo tratamiento con suero salino hipertónico diario en el momento del estudio. 6 pacientes (46,2% del total) estaban recibiendo tratamiento con DNAsa en el momento del estudio. 11 pacientes (84,6% del total) estaban recibiendo tratamiento con salbutamol en el momento del estudio. 7 pacientes (53,8% del total) estaban recibiendo tratamiento con inhibidor de la bomba de protones en el momento del estudio.

Tabla 8: Tratamientos inhalados, nebulizados y orales que estaban recibiendo los pacientes en el momento del estudio.

Aspectos Terapéuticos	Número absoluto (%)
Corticoides inhalados	2 (15,4)
Macrólidos intermitentes	10 (76,9)
Suero Salino hipertónico	9 (69,2%)
DNAsa	6 (46,2)
Salbutamol	11 (84,6)
Inhibidor bomba de protones	7 (53,8)
Colistina nebulizada	7 (53,8)
Colistina y aztreonam nebulizados	2 (15,4)
Tobramicina nebulizada	1 (7,7)

5.2 Aspectos relativos a la muestra

Las 13 muestras (100%) correspondían a esputo inducido. De las 13 (100%) se pudo extraer DNA para realizar el proceso de secuenciación masiva.

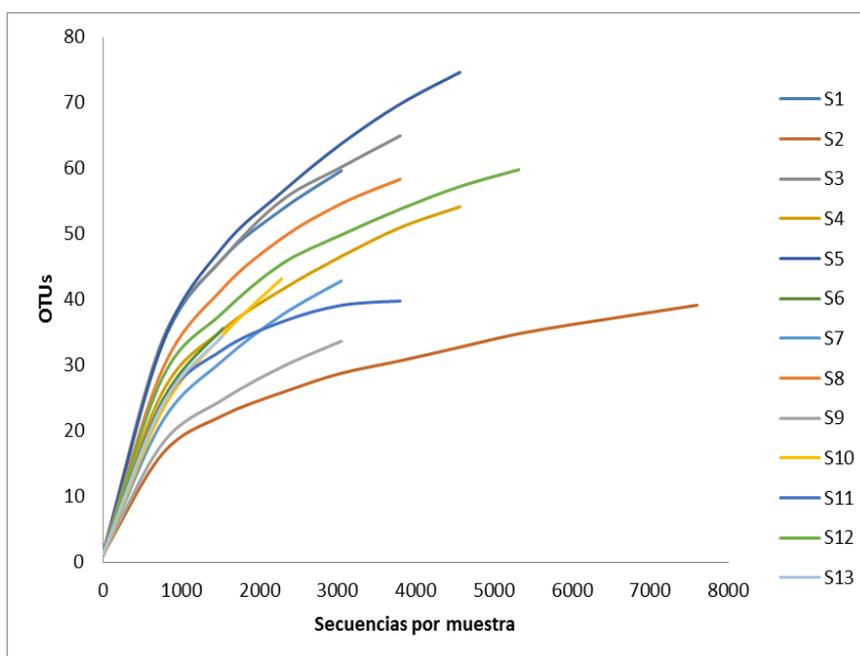
5.3 Análisis molecular de la composición de la microbiota presente en las muestras de esputo de los pacientes

En la *Tabla 9* se presentan los datos descriptivos del número total de secuencias detectadas, y el número de secuencias al que se pudieron asignar organismos. Se pudo asignar el 57,6% de las secuencias aisladas. En la *Figura 14* se presentan las curvas de rarefacción de las 13 muestras, con el número de unidades taxonómicas operativas (OTU) asignadas. Dado el rendimiento de la técnica empleada para este estudio se estableció el género de los microorganismos como OTU.

Tabla 9: Datos de la distribución del total de secuencias aisladas en las 13 muestras, y del número de secuencias que se pudo asignar a alguna OTU

	Total de secuencias aisladas	Secuencias asignadas
Media (desviación estándar)	4048,31 (1626,91)	2332,08 (1008,72)
Mediana	4105	2277,08
Rango (min-max)	6104 (1588-7692)	4048 (987-5035)

Figura 14: Tablas de rarefacción de las secuencias de las 13 muestras estudiadas



5.3.1 Descripción del microbioma, composición de géneros, número, frecuencias, árbol filogenético y heat map

5.3.1.1 Géneros y distribución por muestras

El rango de géneros en las 13 muestras obtenidas osciló entre 9 y 26, con una media de 14,92 y una desviación estándar de 4,80. 5 géneros se encontraron presentes en las muestras de todos de los pacientes: *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Rothia spp*, *Gemella spp* y *Granulicatella spp*. La distribución de los distintos géneros en función de las muestras en las que se encontraban presentes se detalla en la *Tabla 10* y en la *Figura 15*. 14 géneros sólo aparecían como máximo en 1 muestra. La representación del árbol filogenético obtenido de las 13 muestras se expone en la *Figura 16* junto al heat map con los géneros detectados con su abundancia relativa.

Tabla 10: Distribución agrupada de géneros en función de la frecuencia de su presencia en las muestras del estudio

Frecuencia de distribución	Géneros
En la totalidad de muestras	<i>Staphylococcus, Streptococcus, Granulicatella, Gemella, Rothia</i>
Al menos en el 75% de las muestras	(además de las anteriores) <i>Actinomyces, Acaryochloris, Salinicoccus, Arthrobacter</i>
Al menos en el 50% de las muestras	(además de las anteriores) <i>Bullidia, Atopobium, Mogibacterium, Peptoestreptococcus, Facklamia, Abiotrophia</i>
En menos del 50% de las muestras, pero al menos en 2 muestras	<i>Planctomyces, Bifidobacterium, Microbispora, Alloscardovia, Scardovia, Nitrospira, Devosia, Fusobacterium, Capnocytophaga, Shuttleworthia, Bacteroides, Filifactor, Novosphingobium, Nocardia</i>

Figura 15: Distribución logarítmica de los distintos géneros en función de su frecuencia de detección en los participantes del estudio.

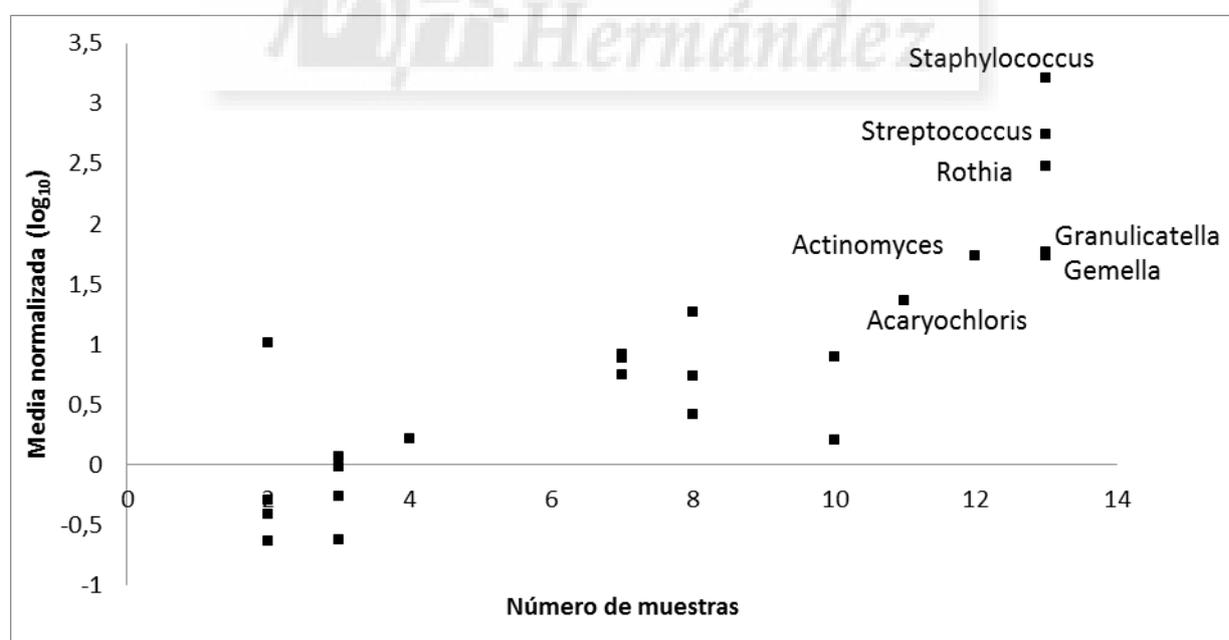
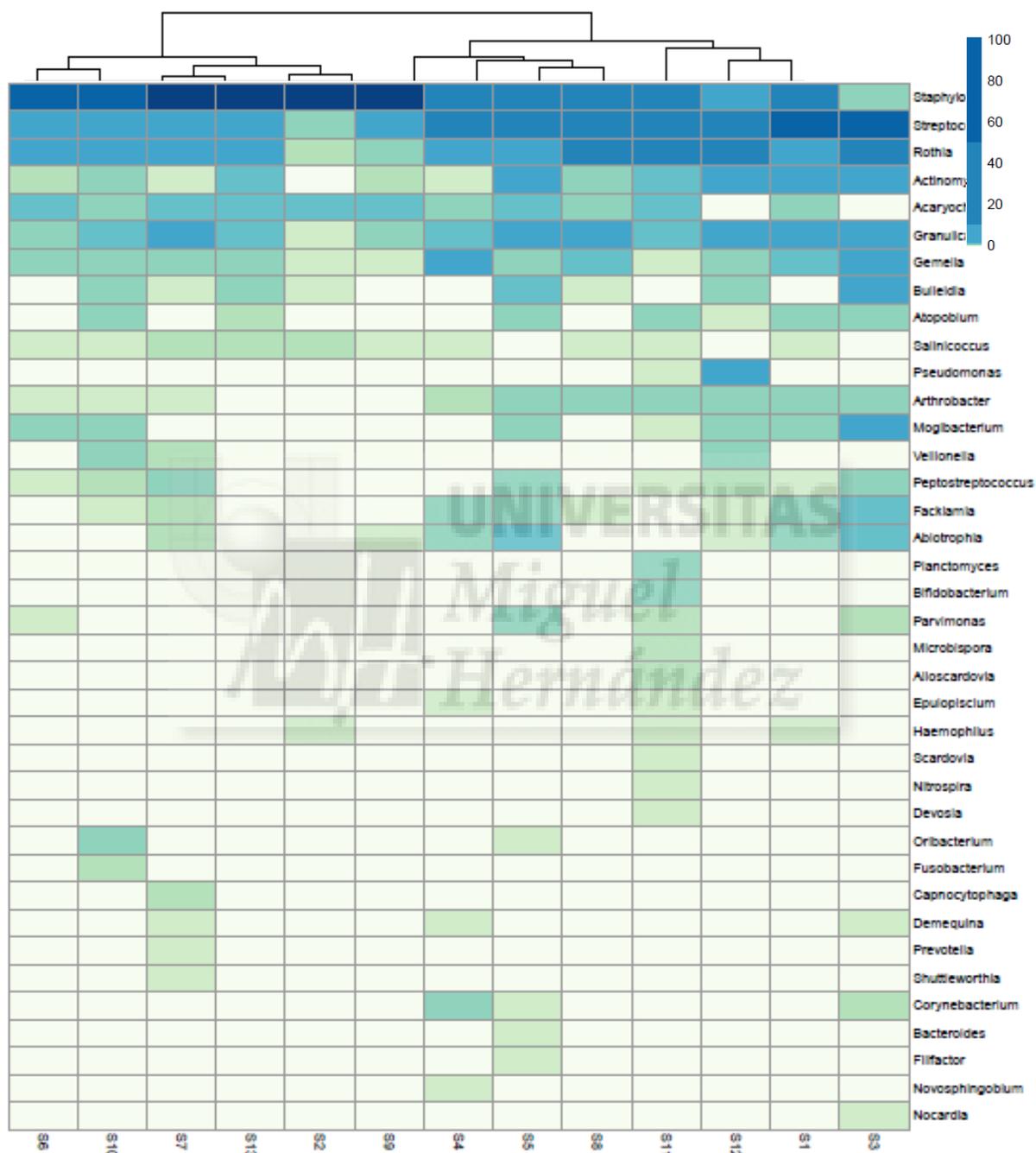


Figura 16: Árbol filogenético del microbioma de las 13 muestras, junto con el heat map con la abundancia relativa de géneros



5.3.1.2 Abundancia relativa, géneros dominantes, núcleo del microbioma

4 géneros presentaron una abundancia relativa mayor al 1% sobre el resto de especies: *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Rothia spp* y *Granulicatella spp*. *Staphylococcus spp* fue el género más abundante en 10 pacientes (76,92% del total), *Streptococcus spp* en 2 (15,38% del total) y *Rothia spp* en 1 paciente (7,69% del total). La frecuencia de *Staphylococcus spp* fue considerada dominante (según los criterios de Coburn et al (157): abundancia relativa mayor, y al menos doble al siguiente género) en 6 pacientes (46,15% del total), y la de *Streptococcus spp* en 2 (15,38% del total). Los rangos de abundancia relativa máxima se hallan expuestos en la *Tabla 11*. La representación gráfica de frecuencias relativas de los distintos géneros detectados en el conjunto de muestras se representa en la *Figura 17*. La abundancia absoluta y relativa de los géneros obtenidos con las secuencias asignadas en cada paciente se representan en las *Figuras 18 y 19*.

Figura 17: Abundancia relativa de los géneros detectados en el global de las muestras del estudio

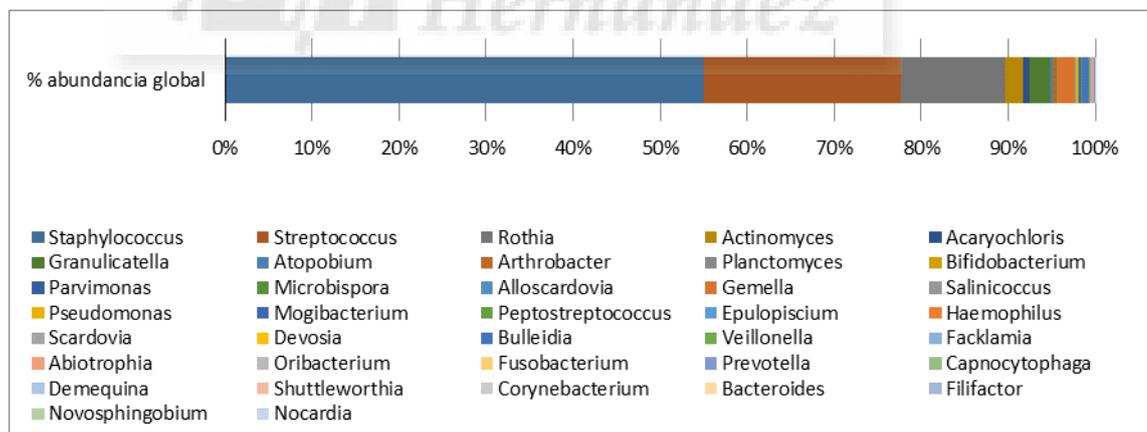


Figura 18: Abundancia absoluta de secuencias identificadas y distribución géneros en los pacientes del estudio

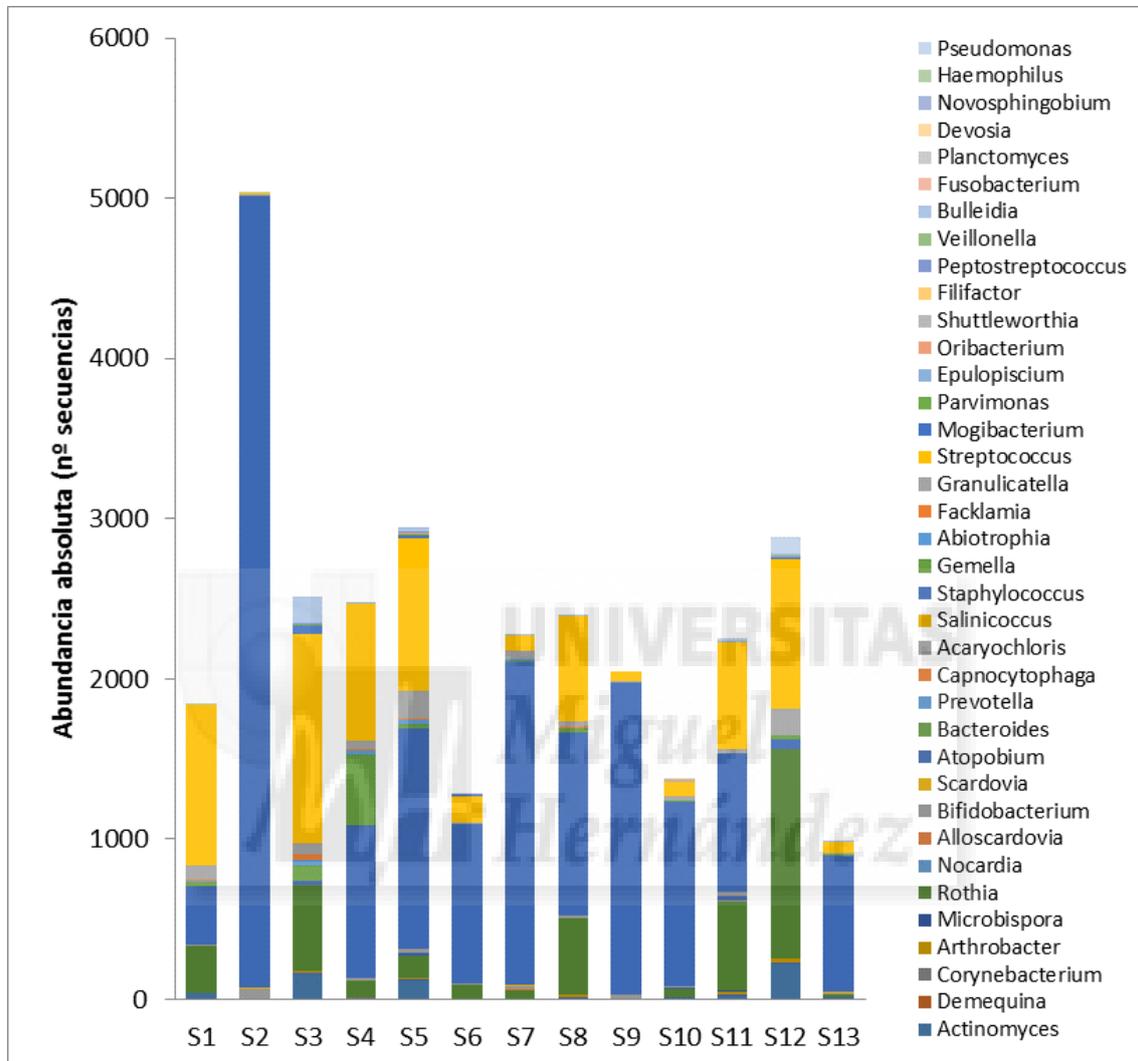
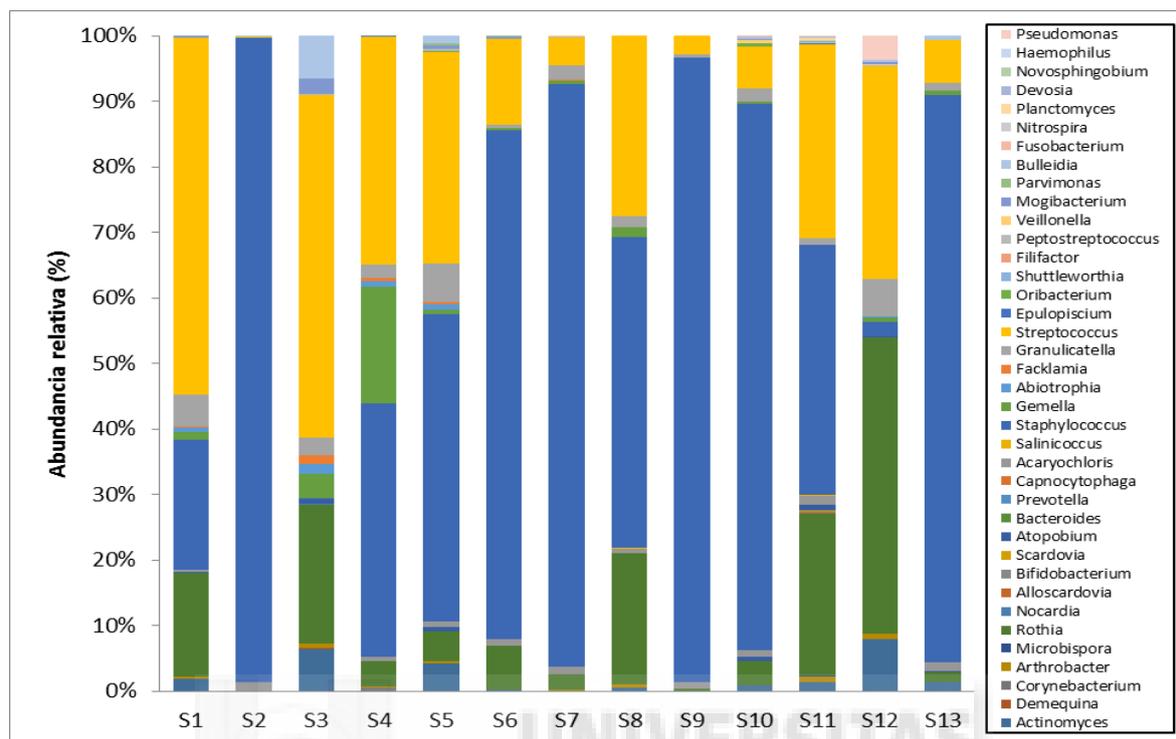


Figura 19: Abundancia relativa de cada género en las secuencias recuperadas de cada paciente del estudio



Mediante los criterios de Coburn (157), se pudo determinar la composición filogenética característica del microbioma de los pacientes (*microbioma core*), que estaba constituido por 4 géneros: *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Rothia spp* y *Granulicatella spp* (Tabla 11).

Tabla 11: Abundancia relativa, dominancia y abundancia relativa máxima de las cuatro géneros que constituían la composición filogenética del estudio (*microbioma core*). (N=número)

Género	N de muestras en las que abundancia relativa es >1%	N de muestras en el que es el más abundante	N de muestras en el que es el dominante (el >frec y >2 veces frec que el siguiente)	Abundancia relativa máxima (%)
<i>Staphylococcus</i>	12	10	6	64,3
<i>Streptococcus</i>	12	2	2	32,02
<i>Rothia</i>	11	1	0	22,5
<i>Granulicatella</i>	6	0	0	3,59

5.3.1.3 Presencia de patógenos clásicos en las secuencias

En el microbioma de 3 pacientes se detectó *Haemophilus spp* (23,07% del total). *Staphylococcus spp* estaba presente en todos los pacientes, y cuando se analizaron las especies, *S. aureus* fue la más frecuente de todos los sujetos detectados en las muestras, seguido de *S. epidermidis*. *Pseudomonas spp* fue detectada en bajo número, sólo en 2 pacientes (15,38%), y en los 2 casos por debajo del 5% del total de géneros. No se detectó la presencia de *Stenotrophomonas spp*, *Achromobacter spp*, *Mycobacterium spp* ni *Burkholderia spp* en ninguna muestra.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
<i>Staphylococcus spp</i> (especie no identificada)	5,3	26,3	0,0	7,4	12,6	20,8	23,0	12,1	26,9	20,0	9,2	0,4	21,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,1	36,7	0,1	10,5	16,2	25,6	30,3	15,0	33,7	21,6	10,3	0,7	31,1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,3	1,0	0,0	0,2	0,3	0,6	0,8	0,6	1,2	0,4	0,2	0,0	0,9
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
total <i>Staphylococcus</i>	11,7	64,3	0,1	18,1	29,2	47,2	54,2	27,7	61,9	42,1	19,8	1,1	53,8

Tabla 12: Distribución de *Staphylococcus spp* presente en las distintas muestras del estudio

5.3.2 Análisis de la diversidad alfa y beta de las comunidades bacterianas estudiadas

5.3.2.1 Alfa diversidad

Los valores de diversidad alfa, expresados por el índice de Shanon-Wiener oscilaron entre 0,11-1,57, con un valor medio de 1,00.

Tabla 13: Estudio descriptivo de los valores del índice de Shanon-Wiener de las muestras estudiadas

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Índice de diversidad. Shannon Wiener	13	,11	1,57	1,0038	,50806

5.3.2.2 Beta diversidad

La comparación entre las 13 muestras mediante el análisis de los componentes principales (ACP) (Figura 20) mostró la existencia de 3 grupos (o cluster) establecidos.

Figura 20: Análisis de los componentes principales de las comunidades bacterianas de las muestras estudiadas

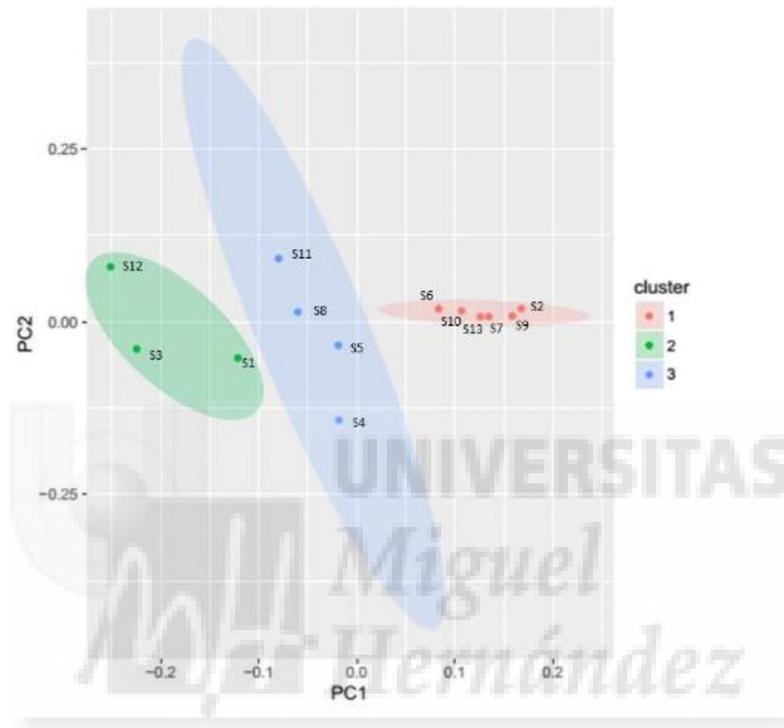
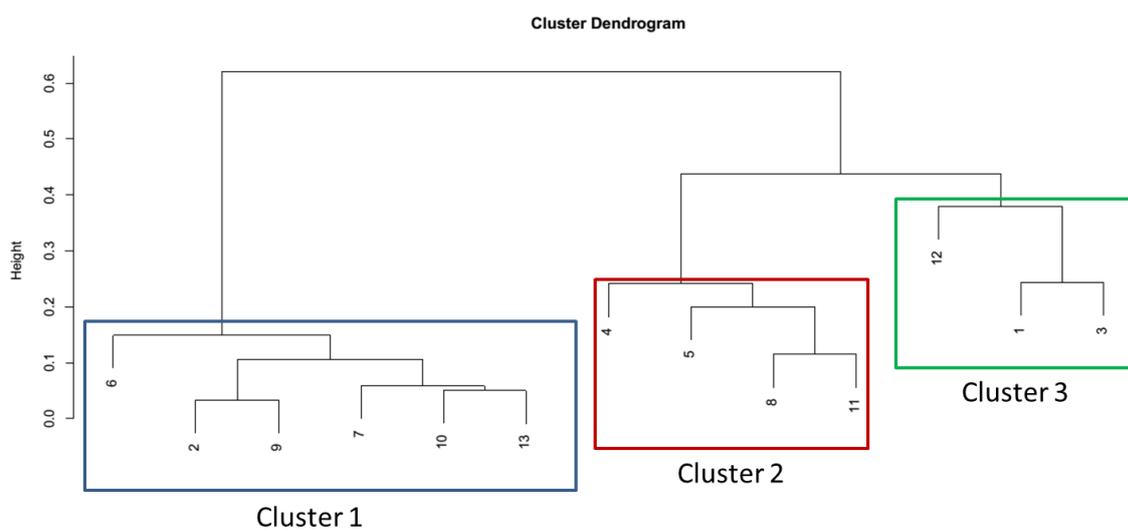


Figura 21: Dendrograma con las distintas agrupaciones obtenidas por el análisis de componentes principales



5.3.2.3 Principales características de los grupos de componentes principales. Relación con el número de géneros y la diversidad alfa

Los pacientes del cluster 1 presentaron una mayor densidad de comunidades de *Staphylococcus spp* que los cluster 2 y 3. A su vez los pacientes del grupo 1 presentaban menor número de colonias de *Actinomyces spp* y *Streptococcus spp*. Los pacientes del cluster 1 poseían un menor número absoluto de géneros (*Figura 22*), sin que la diferencia fuera estadísticamente significativa. Este grupo además presentaba la menor diversidad alfa, expresada con el índice de Shanon (*Figura 23*), y los del grupo 3 presentaban la mayor; estas diferencias sí fueron estadísticamente significativas ($p=0,009$).

La distribución jerárquica de las muestras, relacionadas con los cluster del análisis de los componentes principales, el índice de Shanon y el número de géneros, además de la frecuencia de *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp* y *Actinomyces spp* se representan en la *Figura 24*, figurando los pacientes del cluster 1 en una de los brazos principales del árbol de distribución.

Tabla 14 Relación de los distintos grupos de ACP con el número de géneros y la diversidad alfa

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Contraste de Hipótesis (Kruskal-Wallis muestras independientes)
Media nº de Especies (Desviación Estándar)	12,5 (4,0373)	17,4 (4,00)	16 (1,41)	$p=0,314$
Alfa Diversidad (Índice de Shanon)	0,516 (0,28)	1,38 (0,90)	1,5 (0,091)	$P=0,009$

Figura 22: Relación entre los cluster obtenidos por ACP y el número de géneros. Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

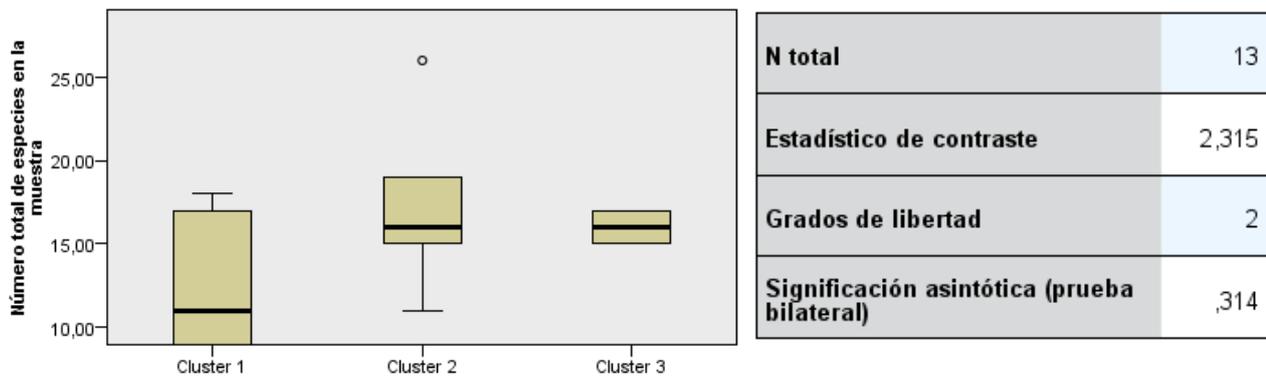


Figura 23: Relación entre los cluster obtenidos por ACP y la diversidad alfa expresada por el índice de Shanon. Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

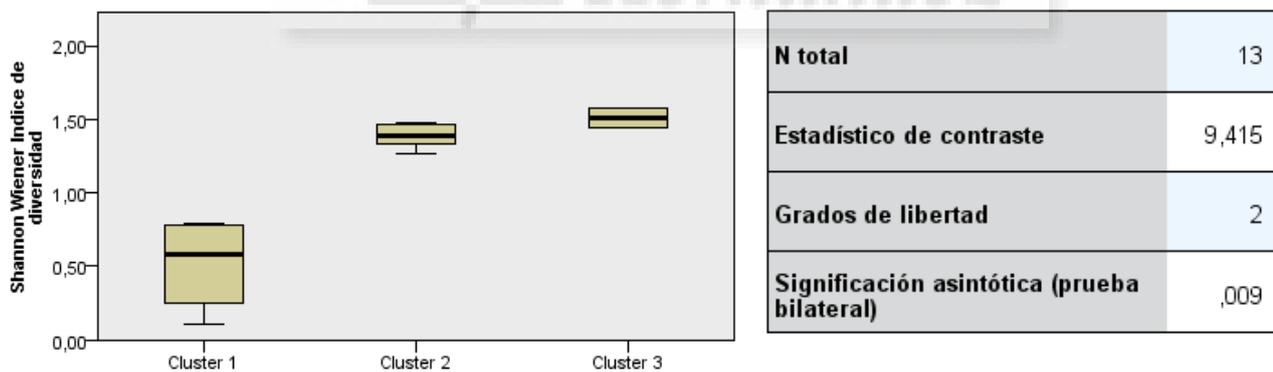
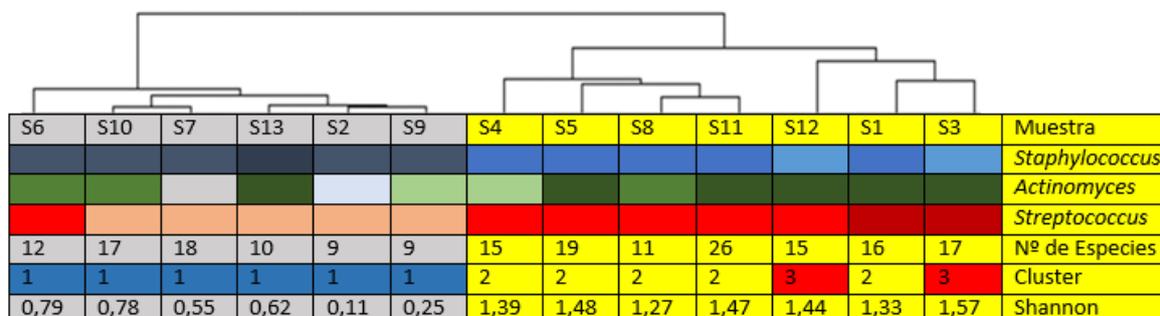


Figura 24: Distribución jerárquica de las muestras obtenidas. En filas se encuentran el mapa de color para la abundancia relativa de *Staphylococcus spp*, *Actinomyces spp*, *Streptococcus spp*, nº total de géneros de cada una de las muestras, correspondencia a los cluster obtenidos por el ACP e índice de Shannon



Como se ha referido, el núcleo del microbioma estaba constituido por 4 géneros presentes en las 13 muestras, que suponían el 10,52 % de la riqueza total de especies. Además, todos los pacientes del grupo I compartían además otros 2 géneros, *Salinicoccus spp* y *Acaryochloris spp*, y los de los grupos II y III, otros 5 (*Actinomyces spp*, *Gemella spp*, *Arthrobacter spp*, *Facklamia spp* y *Peptoestreptococcus spp*). En la Figura 25 se muestra el diagrama de Venn de los distintos géneros obtenidos y en la Tabla 15 los distintos géneros compartidos por los diferentes cluster del estudio.

Figura 25: Diagrama de Venn de la composición del microbioma de los distintos grupos obtenidos por el ACP.

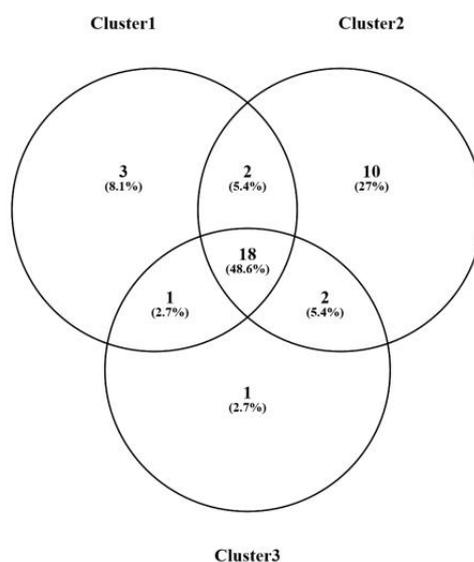


Tabla 15 Composición de géneros compartidos y específicos de los distintos grupos de ACP

Cluster I	Núcleo del microbioma (todos los grupos)	Cluster II y III
<i>Salinicoccus spp</i> <i>Acaryochloris spp</i>	<i>Staphylococcus spp</i> <i>Streptococcus spp</i> <i>Rothia spp</i> <i>Granulicatella spp</i>	<i>Actinomyces spp</i> <i>Gemella spp</i> <i>Arthrobacter spp</i> <i>Facklamia spp</i> <i>Peptoestreptococcus spp</i>

5.3.3.- Análisis comparativo de las comunidades bacterianas en función de las variables clínicas

5.3.3.1 Heat map del análisis filogenético y las variantes clínicas

Se realizó una combinación del heat map de los géneros detectados junto con un agrupamiento jerárquico, incluyendo en las filas las distintas variables clínicas para una visualización global de las variables. Los datos detallados se presentan en la *Figura 26*.

Figura 26: Heat map de los géneros, árbol filogenético y agrupamiento jerárquico de las principales variables del estudio. Las variables cuantitativas fueron reordenadas en categóricas para observar agrupaciones

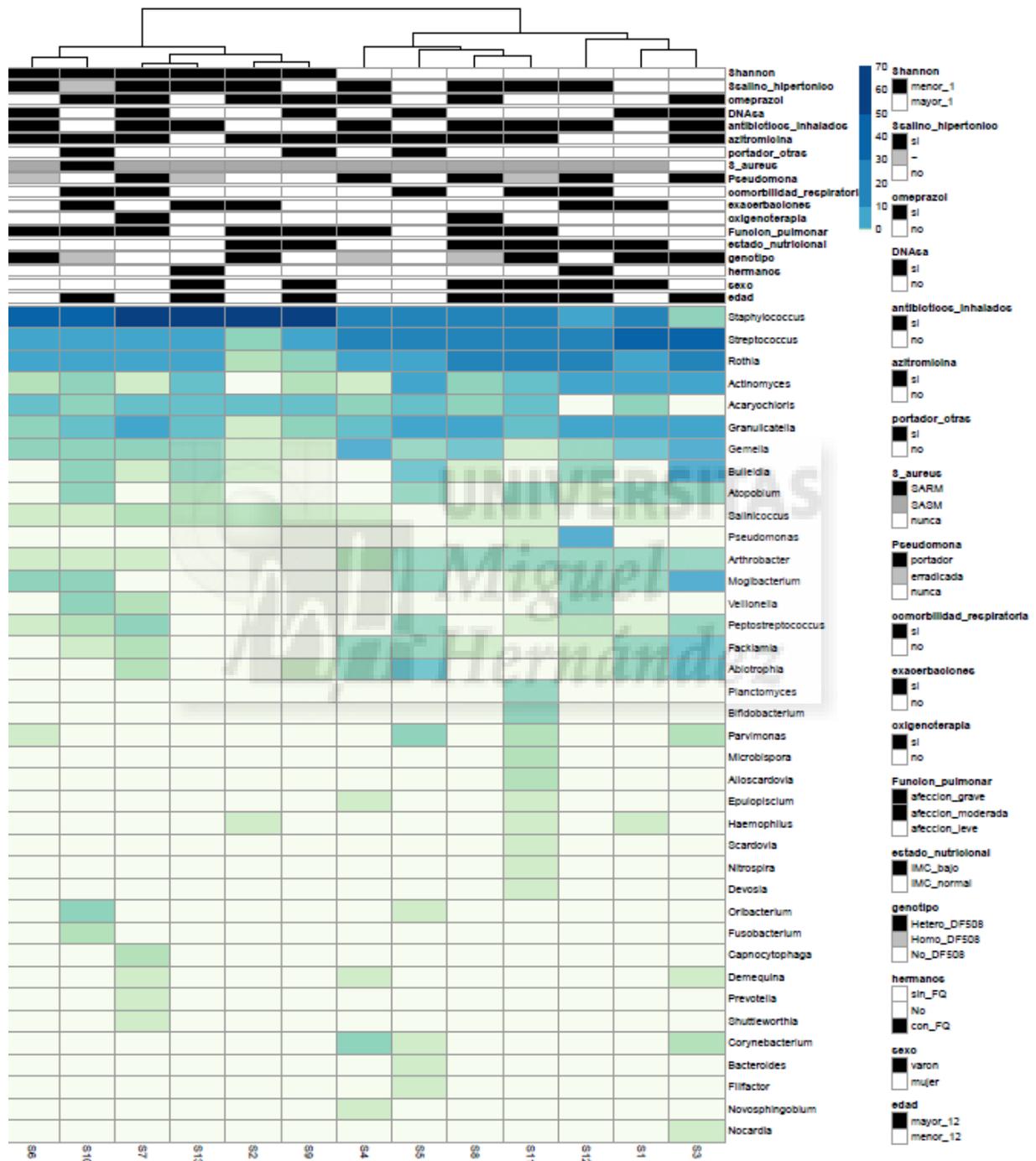
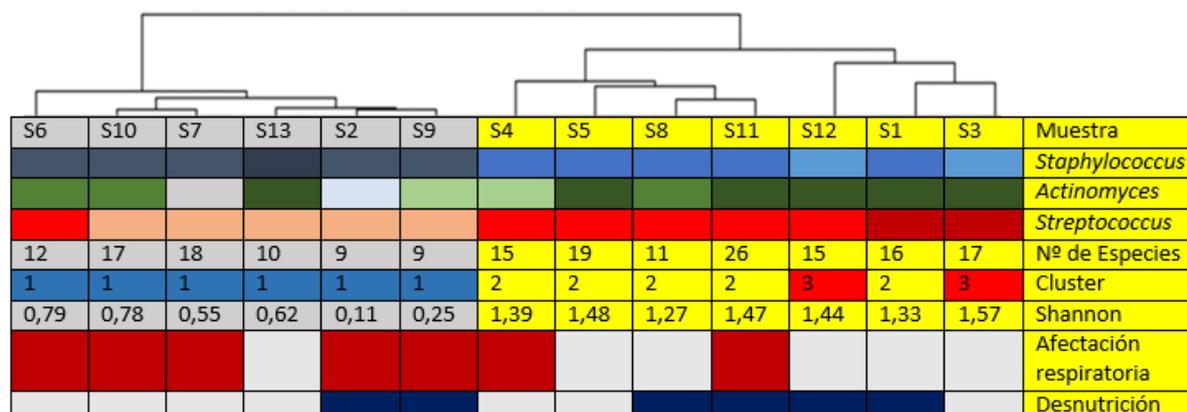


Figura 27: Árbol distribución jeraquizada de árbol filogenético, con la correspondencia con grupo de ACP (cluster), índice de Shanon, afectación respiratoria (rojo: afectación moderada-grave) y estado nutricional (azul oscuro: paciente desnutrido)



5.3.3.2. Bondad de ajuste

Mediante la prueba de Kolmogorov - Smirnov se contrastó la hipótesis de normalidad de las variables cuantitativas continuas. Las variables edad, ratio IMC, valor de FEV1 y número de géneros se consideraron con distribución normal. El índice de Shanon presentó un nivel de significación menor a 0,042 por lo que se consideró la distribución como no paramétrica.

5.3.3.3 Análisis estadístico entre las distintas variables clínicas y la riqueza de especies y diversidad del microbioma

5.3.3.3.a Edad de los pacientes

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la edad y el número de géneros, índice de Shanon o la agrupación en los distintos cluster obtenidos por el análisis de los componentes principales de los pacientes.

Tabla 16

	Diversidad del microbioma	Estadístico	Significancia
Edad	Número de géneros	Correlación de Pearson r=0,061	(Bilateral) p= 0,842
	Alfa diversidad Índice de Shanon	Correlación de Spearman r= 0,085	(Bilateral) p= 0,782
	Cluster obtenidos por Análisis Componente Principales	Kruskal-Wallis para muestras independientes	p=0,610

Los estudios de correlación no mostraron relación lineal entre el número de especies, el índice de Shanon y la edad de los pacientes. *Tablas 17 y 18*

Tabla 17 Correlaciones

		Número total de géneros en la muestra	Edad
Número total de géneros en la muestra	Correlación de Pearson	1	,061
	Sig. (bilateral)		,842
	N	13	13
Edad	Correlación de Pearson	-,061	1
	Sig. (bilateral)	,842	
	N	13	13

Tabla 18 Correlaciones

Rho de Spearman		Shannon Wiener Índice de diversidad	Edad
Shannon Wiener Índice de diversidad	Coefficiente de Correlación	1,000	,085
	Sig. (bilateral)	.	,782
	N	13	13
Edad	Coefficiente de Correlación	,085	1,000
	Sig. (bilateral)	,782	.
	N	13	13

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Edad es la misma entre las categorías de Análisis componentes principales grupo de cluster.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,610	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05

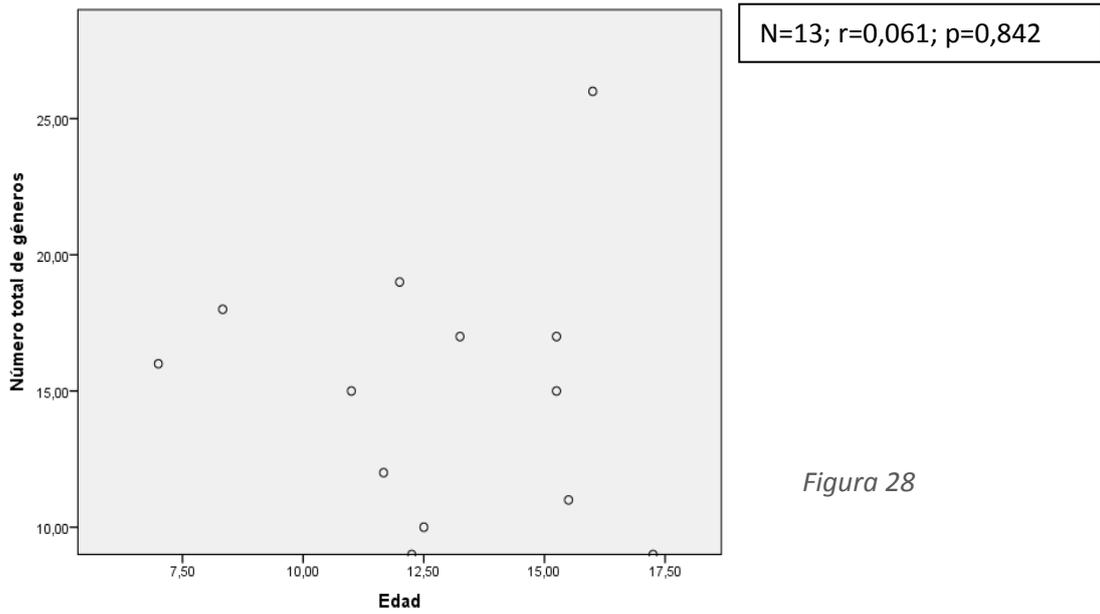


Figura 28

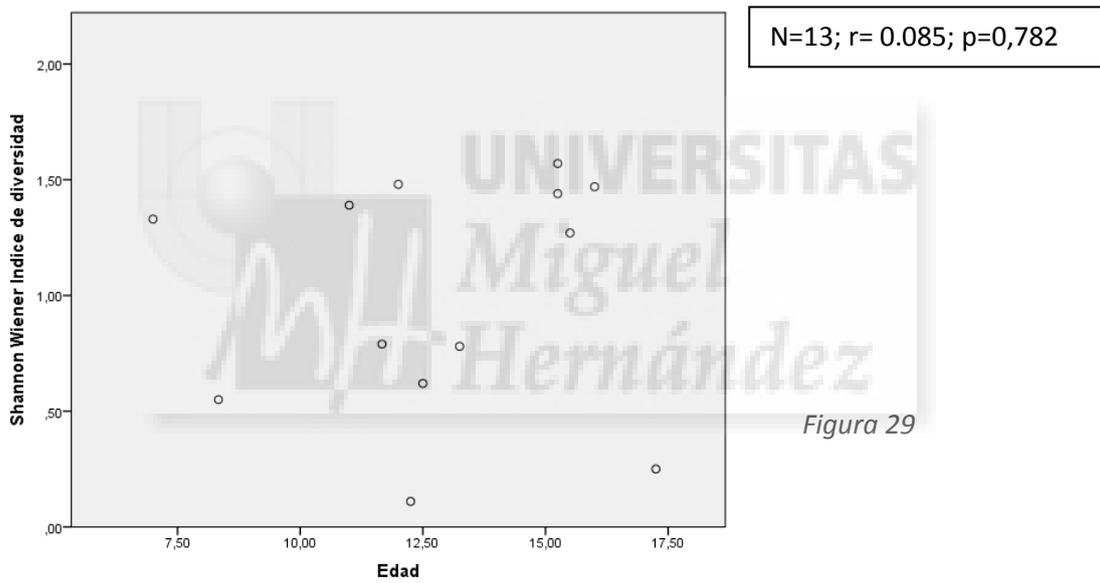
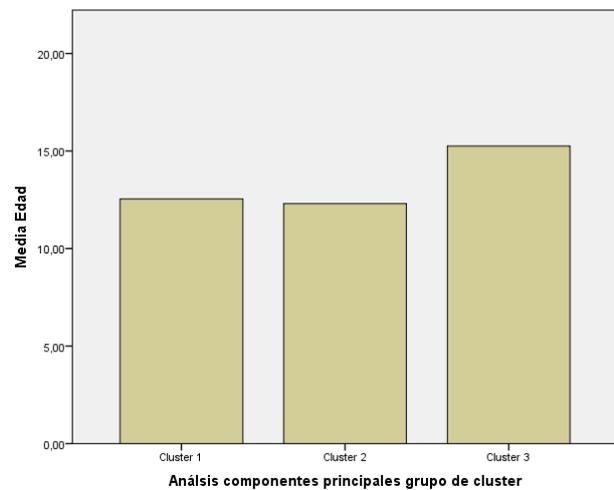


Figura 29

Figura 30



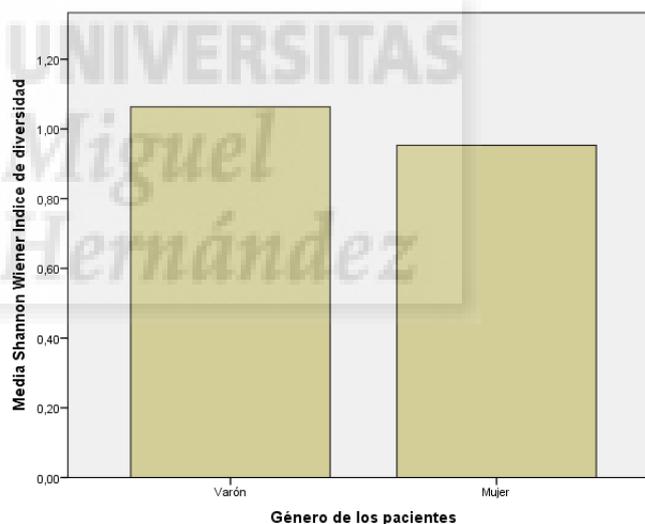
5.3.3.3.b Género de los pacientes

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre varones y mujeres, en el número de géneros en las muestras, índice de Shannon o la distribución en los cluster del análisis de componentes principales.

Tabla 19

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
Género	Número de géneros	t Student= -0,282 (-6,90- 5,33)	(Bilateral) p= 0,332
	Alfa diversidad Índice de Shannon	P de U de Mann-Whitney	p=1 ,0
	Cluster obtenidos por ACP	Chi cuadrado	p= 0,993

Figura 31



Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Shannon Wiener Índice de diversidad es la misma entre las categorías de Género de los pacientes.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	1,000 ¹	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de Shannon Wiener Índice de diversidad es la misma entre las categorías de Género de los pacientes.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	1,000	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Análisis de componentes principales grupo de cluster es la misma entre las categorías de Género de los pacientes.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes	,993	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

5.3.3.3.c Genotipo mutación CFTR

Entre el genotipo y el número de especies no se encontró asociación estadísticamente significativa. Tampoco cuando se valoró globalmente heterocigotos/homocigotos de la mutación DF508 se obtuvo asociación con el resto de mutaciones.

Tabla 20

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
Genotipo CFTR	Número de géneros	ANOVA F= 1,834	p= 0,292
	Alfa diversidad Índice de Shanon	Kruskal-Wallis	P= 0,327
	Cluster obtenidos por ACP	Chi-Cuadrado	P= 0,727

Tabla 21

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
DF508/ Otra mutación	Número de géneros	t Student =-0,277	p= 0,787
	Alfa diversidad Índice de Shanon	P de U de Mann-Whitney	p= 1,0
	Cluster obtenidos por ACP	Chi-Cuadrado	p= 0,727

Tabla 22

ANOVA Número total de géneros

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	217,590	8	27,199	1,834	,292
Dentro de grupos	59,333	4	14,833		
Total	276,923	12			

Tabla 23

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	,638 ^a	2	,727
Razón de verosimilitud	,634	2	,729
Asociación lineal por lineal	,034	1	,854
N de casos válidos	13		

a. 6 casillas (100,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,62.

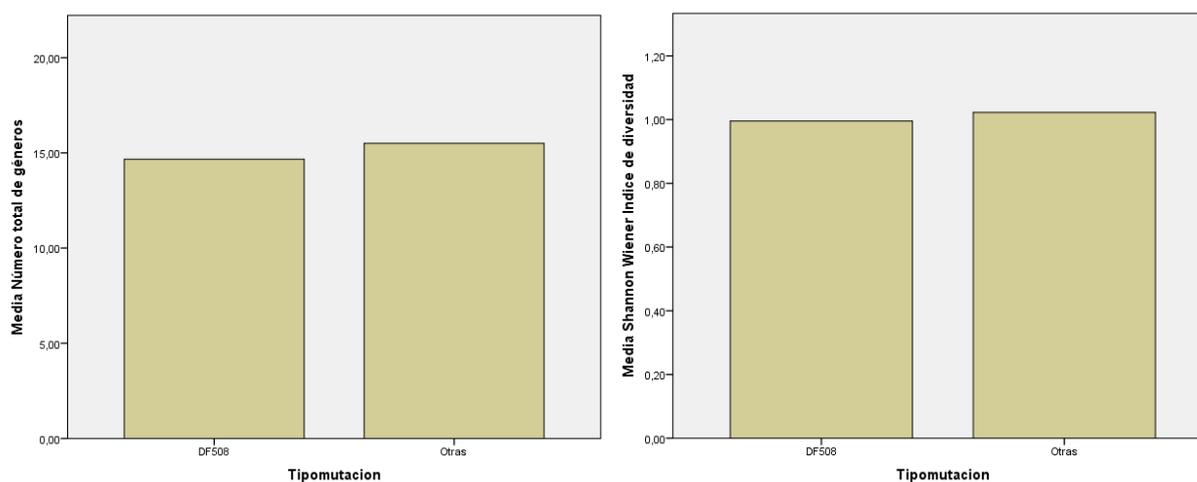


Figura 32

5.3.3.3.d Afectación nutricional

El estado nutricional, definido por IMC (mayor o menor a 1) no presenta asociación estadística con el número de géneros, ni con el Índice de Shannon o con la distribución de los grupos obtenidos por el análisis de componentes principales.

Tabla 24

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
Estado nutricional (normo/ Subnutrido)	Número de géneros	t Student= -0,395 (-7,196-5,0)	(bilateral) p= 0,700
	Alfa diversidad Índice de Shanon	P de U de Mann-Whitney	p=0,731
	Cluster obtenidos por ACP	Chi cuadrado	p=0,672

5.3.3.3.e Comorbilidad respiratoria no relacionada con fibrosis quística

La comorbilidad de patología respiratoria (asma y/o alergia) no repercutió en diferencias estadísticamente significativas en la composición del microbioma entre los pacientes del estudio.

Tabla 25

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
Asma/ alergia	Número de géneros	t Student= -1,55 (-1,67, 9,72)	p= 0,148
	Alfa diversidad Índice de Shanon	P de U de Mann-Whitney	p=0,724
	Cluster obtenidos por ACP	Chi cuadrado	p=0,912

5.3.3.3.f Afectación respiratoria determinada por el valor teórico de FEV1

No se encontró relación estadísticamente significativa entre el valor de FEV1 y el número de géneros, el índice de Shannon o los grupos del análisis de los componentes principales. Se aprecia cierta tendencia, sin significación estadística, entre los cluster y el FEV1, y el grado de afectación respiratoria, observándose una mayor alfa-diversidad en los pacientes con mejor función pulmonar.

Tabla 26

	Diversidad del microbioma	Estadístico	Significancia
FEV1	Número de géneros	Correlación de Pearson $r=0,083$	(Bilateral) $p= 0,789$
	Alfa diversidad Índice de Shannon	Correlación de Spearman $r= 0,346$	(Bilateral) $p= 0,247$
	Cluster obtenidos por ACP	Kruskal-Wallis para muestras independientes	$p=0,577$

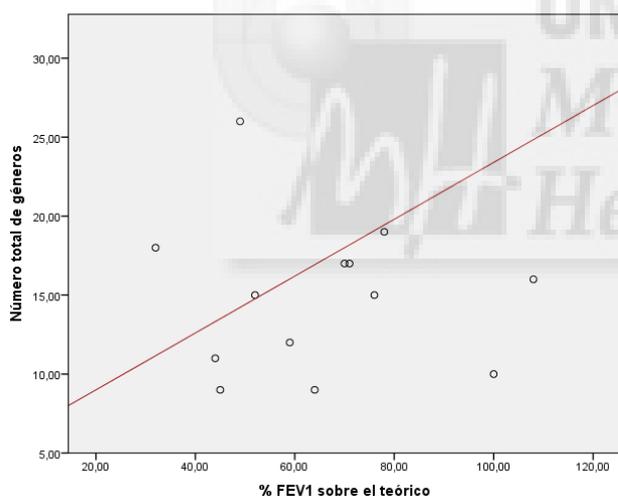


Figura 34

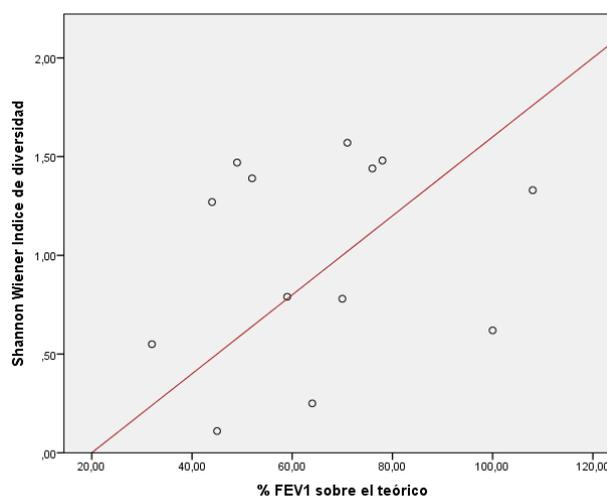
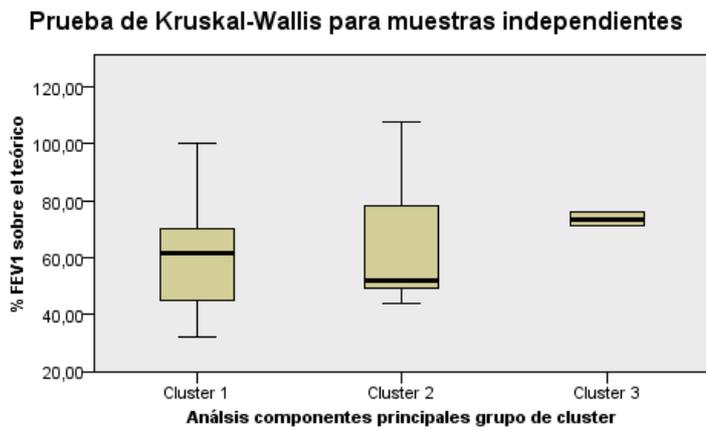


Figura 35

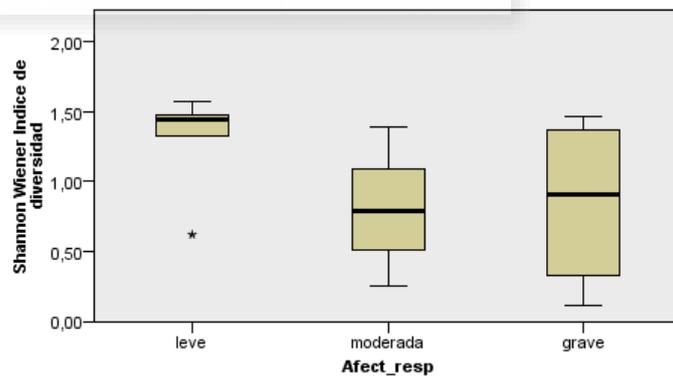


N total	13
Estadístico de contraste	1,099
Grados de libertad	2
Significación asintótica (prueba bilateral)	,577

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

Figura 36



N total	13
Estadístico de contraste	3,086
Grados de libertad	2
Significación asintótica (prueba bilateral)	,214

5.3.3.3.g Antecedente de exacerbaciones respiratorias

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la composición del microbioma, definido por el número de géneros, la diversidad alfa y la distribución de los grupos establecidos por el análisis de los componentes principales entre los pacientes que habían presentado exacerbaciones o no en los tres meses previos a la recogida de muestras.

Tabla 27

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
Antecedente exacerbaciones respiratorias	Número de géneros	t Student = -0,896 (-3,60, 8,55)	(bilateral) p= 0,389
	Alfa diversidad Índice de Shanon	P de U de Mann-Whitney	p= 0,306
	Cluster obtenidos por ACP	Chi-Cuadrado	p= 0,557

5.3.3.3.h Antecedentes de colonización por patógenos clásicos

No se realiza estudio comparativo con *Staphylococcus spp* dado que el 92,3% de los pacientes era portador de la bacteria y no se podían establecer estudios comparativos. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre el antecedente por *Pseudomonas aeruginosa* y el número de géneros, la diversidad alfa y los grupos establecidos por el análisis de los componentes principales.

Entre el estado de portador crónico de *P. aeruginosa* y el número de especies, no hay diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 28

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
Colonización <i>Pseudomonas</i>	Número de géneros	t Student = -0,83 (-6,88,6,38)	(bilateral) p= 0,935
	Alfa diversidad Índice de Shanon	P de U de Mann-Whitney	p= 0,148
	Cluster obtenidos por ACP	Chi-Cuadrado	p= 0,070

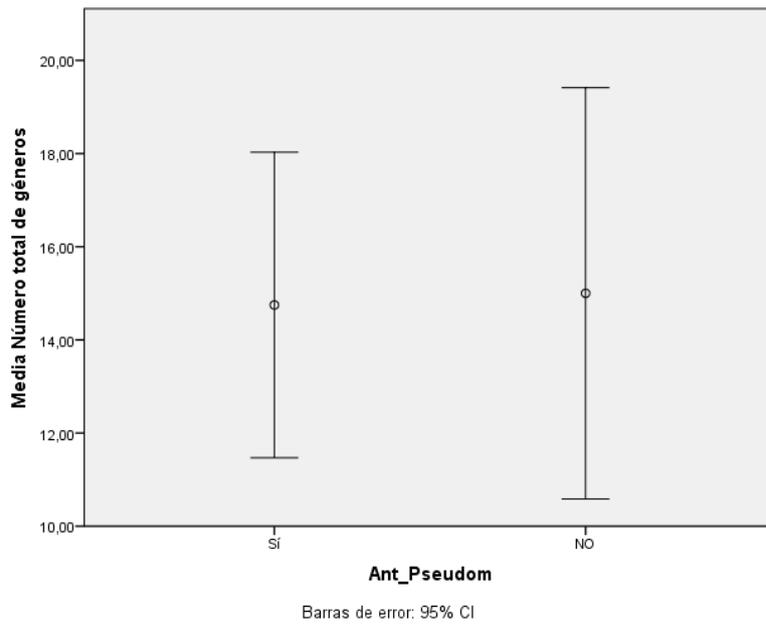


Figura 37

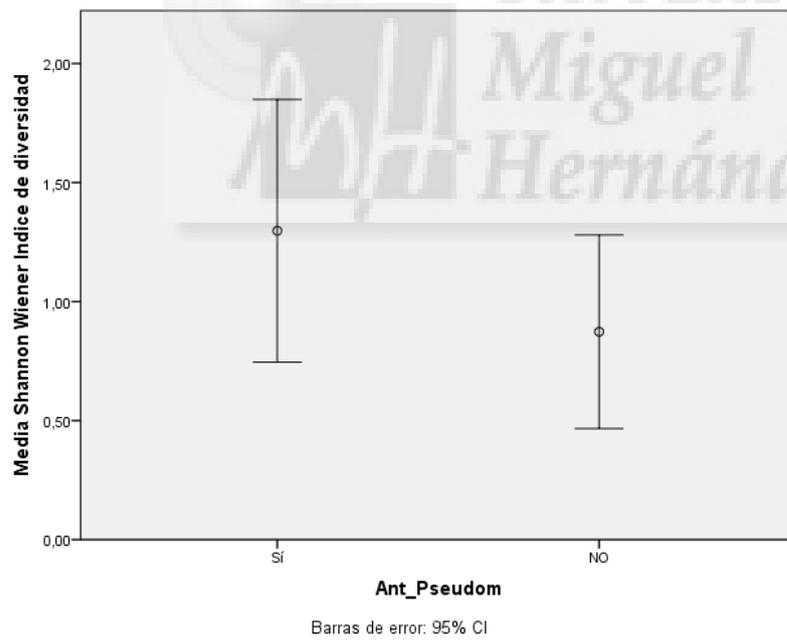


Figura 38

5.3.3.3.i Aspectos terapéuticos de los pacientes

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de géneros, la diversidad alfa y la distribución por el ACP entre los tratamientos que estaban recibiendo los participantes del estudio.

Tabla 29

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
Macrólidos	Número de géneros	t Student = -0,50 (-5,55,8,82)	(bilateral) p= 0,627
	Alfa diversidad Índice de Shanon	P de U de Mann-Whitney	p= 1,0
	Cluster obtenidos por ACP	Chi-Cuadrado	p= 0,612

Tabla 30

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
Antibióticos nebulizados	Número de géneros	t Student = -0,531 (-4,71, 7,71)	(bilateral) p= 0,606
	Alfa diversidad Índice de Shanon	P de U de Mann-Whitney	p= 0,354
	Cluster obtenidos por ACP	Chi-Cuadrado	p= 0,451

Tabla 31

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
Omeprazol	Número de géneros	t Student = -1,460 (-9,81,2,044)	(bilateral) p= 0,935
	Alfa diversidad Índice de Shanon	P de U de Mann-Whitney	p= 0,149
	Cluster obtenidos por ACP	Chi-Cuadrado	p= 0,424

Tabla 32

	Diversidad del microbioma	Estadístico (IC al 95%)	Significancia
DNAsa	Número de géneros	t Student = -1,62 (-5,68,6,58)	(bilateral) p= 0,874
	Alfa diversidad Índice de Shanon	P de U de Mann-Whitney	p= 0,836
	Cluster obtenidos por ACP	Chi-Cuadrado	p= 0,940

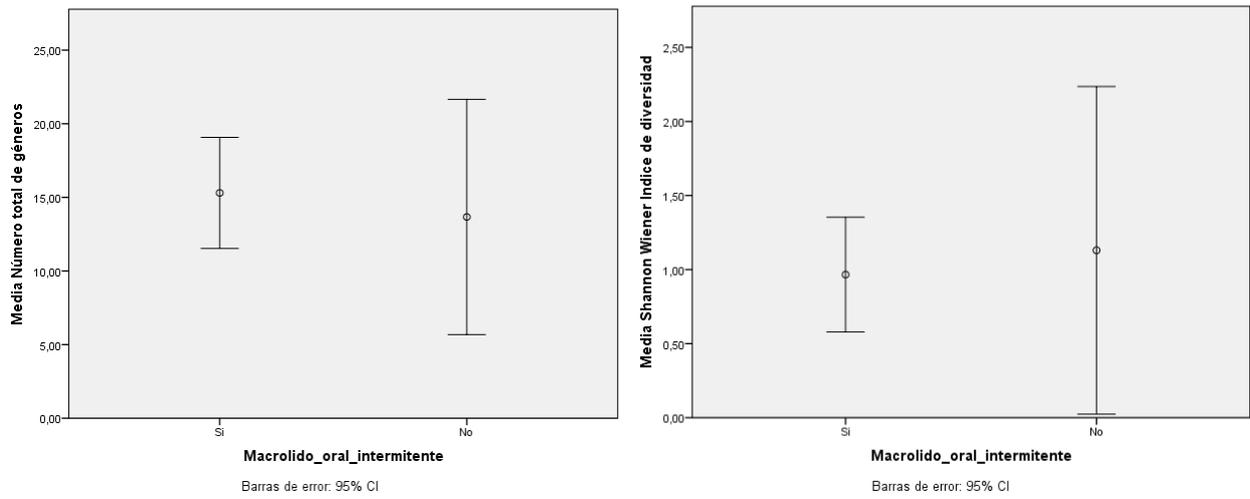


Figura 39

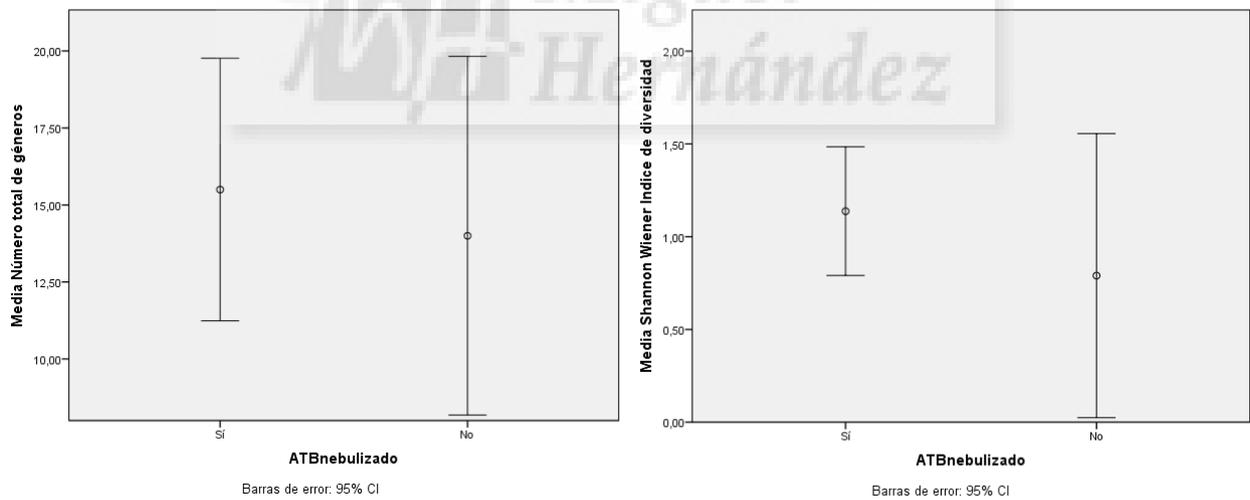


Figura 40

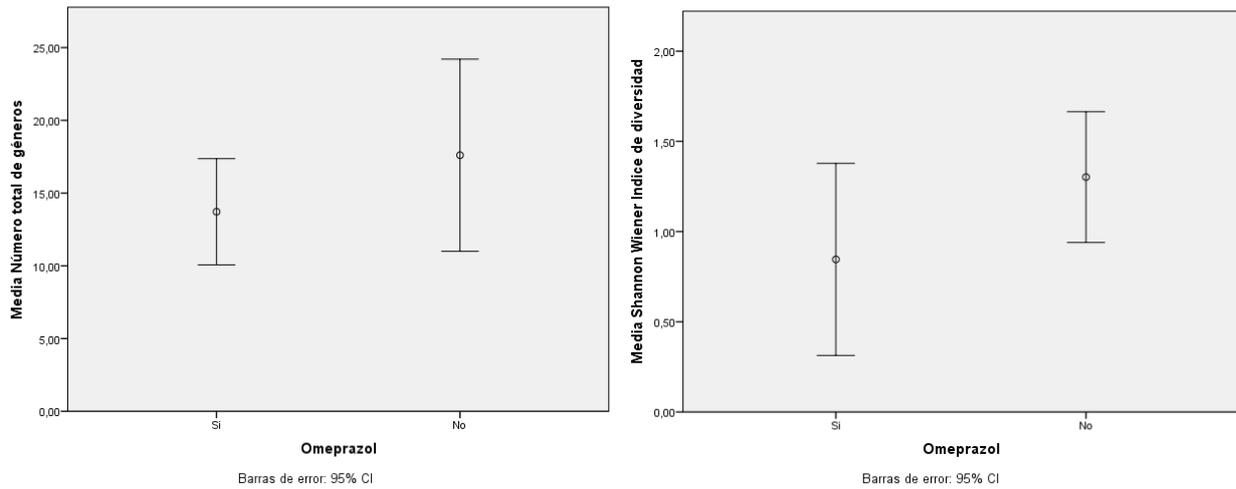


Figura 41

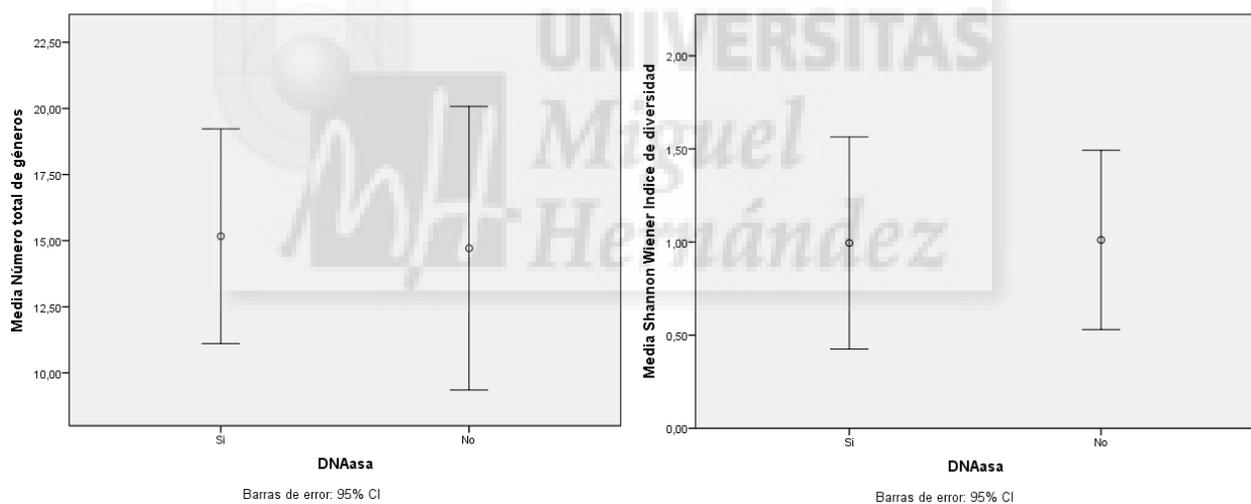
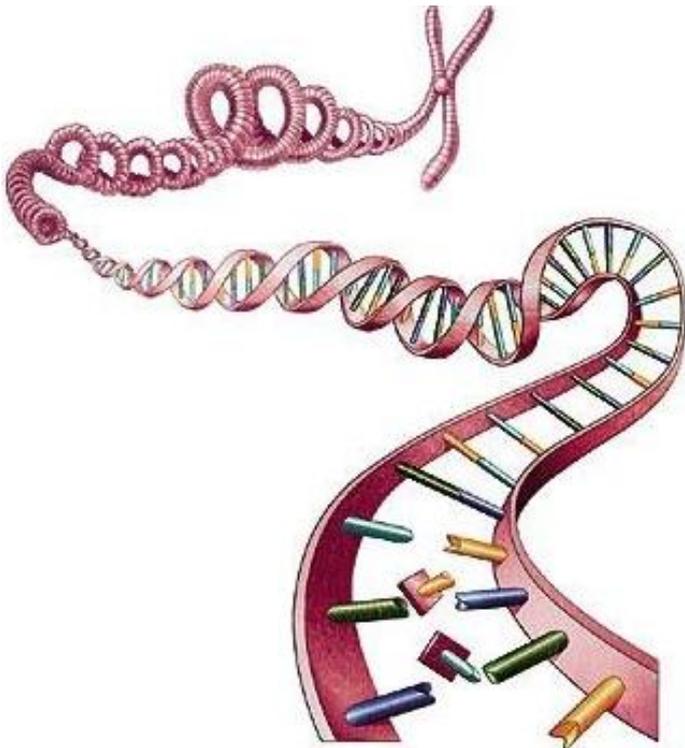


Figura 42

5.3.3.3.j Estudio estratificado de variables de confusión

Se realizó un estudio estratificado de la posible asociación entre variables explicativas que pudieron actuar como factores de confusión (antecedentes de antibioterapia previa, genotipo, antecedentes de exacerbación...), con la variable principal (número de géneros y diversidad), sin encontrar asociación estadísticamente significativa entre éstas.





DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN

6.1 Sentido del estudio

Los estudios sobre el microbioma en pacientes con FQ generan la necesidad de determinar la relación existente entre la composición y la diversidad de las comunidades bacterianas en las vías respiratorias con la evolución clínica de la enfermedad y una serie de variables relacionadas con el paciente y los tratamientos recibidos. La presencia de gérmenes no detectables por los métodos tradicionales, muchos de ellos con significado incierto en la historia natural de la enfermedad, debe correlacionarse con aspectos mejor conocidos en la evolución clínica y el pronóstico, como el genotipo y la evolución de la infección y colonización por los gérmenes clásicos (185).

En los últimos años se está ampliando el campo del conocimiento de las comunidades bacterianas, pero los resultados son desiguales entre los distintos pacientes y segmentos de población estudiados, en ocasiones muy heterogéneos. El grupo de pacientes incluido en nuestro estudio correspondía a un segmento bien delimitado de población pediátrica, y aun así la composición del microbioma presentó una importante variabilidad interindividual en su estructura, composición y diversidad de las comunidades bacterianas, incluso en pacientes con una situación clínica similar. Es necesario que se perfile una visión global del microbioma en las vías respiratorias en pacientes con FQ, así como sus utilidades clínicas. Para este fin se requiere un mayor número de estudios, tanto en grupos de edad y situación clínica específica, así como estudios longitudinales y comparativos entre grupos de pacientes.

El desarrollo de estudios a partir de estudios exploratorios, como el nuestro pueden ayudar a la comprensión de algunos interrogantes como pueden ser:

- . la presencia de inflamación sin infección,
- . la presencia de desequilibrios entre especies (disbiosis)
- . la dinámica de la progresión de la enfermedad pulmonar

La integración de estos conocimientos puede conferir una ventana de oportunidad, como tratamientos selectivos y mejor dirigidos (219).

6.2 Características de la población estudiada

Los pacientes del estudio se encuentran en un intervalo de edad en el que, según los métodos de cultivo tradicionales, se produce la colonización crónica de los patógenos clásicos (220) y también, según los estudios de secuenciación masiva, la transición de la composición del microbioma en las vías respiratorias (157).

El grupo, aunque limitado en su número, presenta características demográficas y de distribución de variables clínicas que permiten realizar estudios de grupos relativamente homogéneos. Para poder establecer comparaciones entre estudios en población con FQ, con un grado tan heterogéneo de afectación, resulta fundamental conocer las características genotípicas y fenotípicas de los sujetos a estudio. Todos los pacientes de nuestro trabajo presentan criterios diagnósticos de FQ, y en cada uno de ellos se conoce la mutación completa responsable de la enfermedad. También hay que destacar que todas las mutaciones están descritas dentro la clase funcional grave, y todos los pacientes presentan insuficiencia pancreática, como en la mayoría de la literatura estudiada. Hay que tener en cuenta que el diagnóstico neonatal de FQ en población asintomática traerá un importante número de sujetos con formas paucisintomáticas, con características clínicas diferentes a los pacientes que incluyen pacientes con formas clásicas de FQ, con insuficiencia pancreática y enfermedad pulmonar grave progresiva.

En cuanto a la función respiratoria determinada por FEV1, se pudo agrupar a los pacientes homogéneamente en grupos de afectación leve, moderada y grave. Menos de la mitad (38%) de los pacientes era portador crónico de *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que la gran mayoría era portador de *Staphylococcus aureus*, lo que coincide en parte con datos de otros estudios a nivel internacional, como el Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry (CFFPR) (72), en el que se aprecia una prevalencia de portadores de *S. aureus* del 80% (con más de un 30% de SAMR), y unos datos de prevalencia de *P. aeruginosa* del 30% entre los 7-10 años, y del 45% entre los 11 y 17 años. Los datos recientemente publicados de un estudio multicéntrico realizado en nuestro país (221), en los que la edad media de los pacientes incluidos fue 9 años mayor que la de nuestro estudio, revelan una prevalencia de colonización crónica por *P. aeruginosa* del 46%, por lo que consideramos que la muestra era representativa del estado de colonización bacteriana a esta edad.

6.3 Aspectos metodológicos

6.3.1.- ¿Es el esputo una muestra válida para el estudio del microbioma de las vías respiratorias inferiores?

Con el desarrollo de técnicas de estudio metagenómico se ha planteado si las muestras de esputo son representativas de la microbiota de las vías respiratorias inferiores.

Por una parte se encuentran diferencias en la composición del microbioma entre la cavidad oral y las vías respiratorias inferiores. Algunos autores afirman que la muestra se contamina en el paso por la faringe del enfermo, adquiriendo gérmenes ausentes en realidad en las vías respiratorias intratorácicas (185). Sin embargo, otros autores consideran que la categorización de la microbiota según la localización en las vías respiratorias, no deja de ser un concepto artificial, dado que existe una migración de gérmenes de la orofaringe a la vía inferior, lo que constituye un determinante relevante del microbioma de las vías respiratorias inferiores en la salud (145) y en la FQ (222). A su vez, otras líneas de evidencia afirman que el contacto de la muestra con bacterias orales tiene escaso impacto en el estudio de la microbiota de las vías inferiores (223). Otros estudios han encontrado diferencias significativas entre las comunidades de la cavidad oral, y las muestras de esputo inducido (172). A su vez, las muestras de esputo presentan dominancia por bacterias que no son consideradas como componentes mayores de la flora oral. A su vez, se ha observado un deterioro progresivo de las comunidades bacterianas en el esputo de pacientes adultos con FQ paralelo al deterioro de la función pulmonar, con dominancia de patógenos clásicos de la FQ y no comensales de la vía oral, como *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Achromobacter spp* (174). En nuestro estudio, la mayoría de las muestras presentan un alto número de *Staphylococcus spp*, lo que concuerda con los cultivos bacteriológicos previos, es decir, con la historia natural de la infección en pacientes con FQ en este grupo de edad. *Staphylococcus spp* no es un germen predominante en la cavidad oral, y cuando se aísla se considera como una parte de la microbiota de transición (224).

6.3.2.- Técnica

La metodología empleada en el estudio se sitúa a la vanguardia de la secuenciación masiva actual, tanto desde el punto de la eliminación del genoma humano como del método de detección de secuencias. Si no se realiza la eliminación del genoma humano y no se amplifican los genomas bacterianos, se pierde gran parte de la profundidad analítica de este proceso de secuenciación. Como contrapartida, estos dos procedimientos empleados pueden introducir sesgos aún no bien conocidos en el momento actual pero la escasa cantidad de muestra que se puede obtener de estos pacientes y la alta carga de DNA humano hace imprescindible, a día de hoy, la realización de este procedimiento.

6.3.3.- Bacterias vivas o muertas, ¿relevante?

Con frecuencia, los estudios que han aplicado técnicas de secuenciación masiva no han diferenciado el material genético de bacterias vivas y bacterias no viables. El DNA de bacterias no viables en la matriz extracelular contribuye significativamente en la cantidad total de DNA bacteriano de las muestras de esputo (195). Muchas técnicas basadas en el estudio y amplificación del DNA empleadas para detectar bacterias en muestras clínicas son incapaces de discriminar entre las bacterias vivas y bacterias muertas. Esto puede tener su repercusión a la hora de conocer el impacto de tratamientos antibióticos recientes. No obstante, se están desarrollando técnicas para seleccionar a las bacterias viables, como el monoácido de propidium (PMA), pero éste puede dar una imagen distorsionada del microbioma total dependiendo de la aplicación de la técnica y el tipo de bacteria. Además algunos autores consideran relevante conocer el DNA extracelular por si corresponde a bacterias con significación clínica, como *P. aeruginosa* (225).

En nuestro estudio finalmente no se aplicó ningún sistema de discriminación entre bacterias vivas y muertas porque los protocolos no están desarrollados suficientemente para poder ser aplicados en este tipo de muestras.

6.4.- Composición del microbioma en niños con fibrosis quística, y su relación con las variables clínicas

6.4.1. Composición del microbioma, similitud con otros estudios y microbioma de población sana

Los estudios de pacientes sanos han demostrado consistentemente una composición similar de los grupos taxonómicos, con presencia uniforme de *Streptococcus spp*, y también anaerobios como *Prevotella spp* y *Veillonella spp* (143,226). Estas especies se encuentran en el núcleo del microbioma de pacientes con FQ en edad pediátrica, que incluye además otras especies como *Rothia spp*, *Staphylococcus spp* y *Actinomyces spp* (167). No obstante el microbioma respiratorio en pacientes con FQ presenta un importante variabilidad en su composición y diversidad entre individuos, y también a lo largo del curso de la enfermedad (157). Los gérmenes considerados patógenos como *Pseudomonas spp*, *Burkholderia spp*, *Stenotrophomonas spp* y *Achromobacter spp* son mucho menos frecuentes que los componentes principales del microbioma, pero presentan una fuerte tendencia a dominar al resto de comunidades cuando aparecen.

Staphylococcus spp fue el género más abundante detectado en nuestro estudio. La frecuencia de *Staphylococcus spp* fue considerada dominante (según los criterios de Coburn et al (157): abundancia relativa mayor, y al menos doble al siguiente género) en 6 pacientes (46,15% del total). Hay que considerar que el 92% de los pacientes presentaba colonización crónica por *S. aureus*, patógeno dominante en este grupo de edad, previa a la progresión a la colonización por *P. aeruginosa* (147, 220).

En nuestro estudio no se detectó la presencia del género *Mycobacterium spp*. Las micobacterias no tuberculosas son relativamente frecuentes en pacientes con FQ de larga evolución. Precisamente, la edad superior a los 20 años es el principal determinante para su aislamiento (227). Ésta podría ser una de las causas que justificarían su ausencia en el microbioma de los pacientes del estudio.

6.4.2. Número de géneros que integran el microbioma y diversidad, y relación con grupos de análisis de componentes principales

El número absoluto de géneros aislados presentó una importante variabilidad entre las muestras, con diferencias superiores al 50% en su cantidad, así como en los valores de alfa diversidad, expresados por el índice de Shanon-Wiener, con diferencias de hasta 10 veces su valor entre los sujetos de nuestro estudio.

La comparación del microbioma entre las distintas muestras de los participantes mediante el análisis de componentes principales, mostró la existencia un grupo claramente diferenciado, con una mayor densidad de *Staphylococcus spp*, frente a otros dos grupos con mayor densidad de *Actinomyces spp* y *Streptococcus spp*. El grupo con mayor densidad de *Staphylococcus spp* poseía un menor número absoluto de géneros, y también una menor diversidad alfa expresada mediante el índice de Shannon. En otros trabajos (228) también se ha observado esta relación inversamente proporcional entre *Staphylococcus spp* y la alfa diversidad, y que el predominio de *Streptococcus spp* se asocia a un microbioma con mayor diversidad (157), lo que normalmente acontece en pacientes con menor progresión de la enfermedad pulmonar.

6.4.3. Relación del microbioma con el estado de la enfermedad pulmonar y edad de los pacientes

Se ha observado que la diversidad de las poblaciones bacterianas en individuos sanos es mayor que en los enfermos con FQ (159). Esta pérdida de diversidad en FQ se produce progresivamente con la edad y la enfermedad pulmonar (157). El microbioma de lactantes y preescolares con FQ sin afectación pulmonar parece ser dominado por *Streptococcus spp* y géneros anaerobios como *Prevotella spp* y *Veionella spp* (176), como en los sujetos sanos (201). Pese a la carencia de estudios longitudinales, la diversidad parece ir incrementándose hasta la primera década de vida, período en el que la función pulmonar suele estar relativamente conservada (157). La diversidad comienza una progresiva disminución desde la adolescencia a la edad adulta, paralelamente a los parámetros de

función pulmonar y las remodelaciones estructurales de las vías respiratorias por la progresión de la enfermedad (167). Como en otros estudios transversales, en nuestro trabajo se observa una correlación directamente proporcional entre diversidad y función pulmonar. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, seguramente por el número reducido de sujetos, se observó que la presencia de un perfil de microbioma con escasa alfa diversidad, bajo número de especies, y alto número de *Staphylococcus spp* se relacionaba con una peor función pulmonar expresado por FEV1.

¿Esta relación es relevante de por sí, o traduce un fenómeno de selección de *Staphylococcus spp* más resistentes a los antibióticos en pacientes con mayor deterioro pulmonar que obligue a tratamientos antibióticos que reduzcan de forma colateral el número y diversidad de colonias que integran el microbioma?. En nuestro estudio, el análisis estratificado no mostró una relación independiente entre el tratamiento antibiótico y la afectación pulmonar. No se encontraron diferencias entre la diversidad alfa y la edad de los pacientes, pero esta circunstancia pudo deberse a que el estudio sólo incluía un rango delimitado de edad.

Aunque la asociación entre edad, diversidad y función pulmonar está bien establecida en los estudios, los mecanismos etiológicos por los que se produce esta asociación todavía no han podido ser claramente determinados (225,229). Posiblemente, con la realización de estudios longitudinales con inicio en el diagnóstico de la enfermedad hasta la edad adulta, se podrá determinar mejor los factores determinantes de los cambios en el microbioma relacionados específicamente con el deterioro respiratorio, para poder optimizar las estrategias de tratamiento y prevenir o enlentecer el daño pulmonar.

6.4.4. Exacerbaciones

Las técnicas de secuenciación masiva se han aplicado para conocer la evolución dinámica del microbioma durante las exacerbaciones en la FQ, con resultados que muchas veces discrepan de los modelos teóricos establecidos de la enfermedad, como en exacerbaciones respiratorias, en las que se pensaba que se producía un incremento del número de gérmenes en las vías respiratorias, y dominación por los patógenos clásicos como *Pseudomonas aeruginosa*. En los recientes estudios que emplean métodos

independientes de cultivo no se ha encontrado un incremento de la densidad de especies durante estos episodios (230), ni tampoco se ha podido encontrar unos cambios en la composición del microbioma que puedan predecir una exacerbación. Incluso algunos estudios han encontrado una disminución de la abundancia absoluta y relativa de *P. aeruginosa* durante las exacerbaciones (169), lo que sugiere que algunas bacterias menos abundantes juegan un papel en estas situaciones clínicas. Otro estudio (168), que evalúa la resistencia y resiliencia de las especies del microbioma durante las exacerbaciones y el tratamiento subsecuente, determina que una mayor abundancia relativa de *P. aeruginosa* no presenta un impacto negativo durante las fases de exacerbación. Por tanto, los patógenos clásicos, como *P. aeruginosa*, aunque tienen un papel crucial en la evolución de la neumopatía, no siempre son los responsables de las exacerbaciones respiratorias en FQ. La mitad de los pacientes incluidos en nuestro estudio que habían sufrido exacerbaciones en los 6 meses previos al estudio no eran portadores crónicos de *P. aeruginosa*. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la composición del microbioma, definido por el número de géneros, la diversidad alfa y la distribución establecida por el análisis de componentes principales entre los pacientes que habían presentado exacerbaciones en los tres meses previos a la recogida de muestras y los que no. Estos hallazgos pueden sugerir la presencia de gérmenes no cultivables, o situaciones de disbiosis que podrían justificar exacerbaciones con cultivos microbiológicos negativos.

6.4.5. Otras variables clínicas

Además de los estudios analíticos que evaluaban la diversidad bacteriana y el grado de afectación pulmonar, se han realizado otros estudios que han tratado de analizar la influencia de otras variables en el estado del microbioma (231).

6.4.5.1. Genotipo y otras variables

Algunos estudios longitudinales (167,176) han encontrado que los pacientes homocigotos con la mutación $\Delta F508$ presentan una disminución de la diversidad comparada con los pacientes heterocigotos a dicha mutación y pacientes que no son

portadores de $\Delta F508$ en ningún alelo. En nuestro estudio no se han encontrado diferencias significativas ni en el número de géneros, ni en la diversidad de las comunidades bacterianas en relación al estado de portador de $\Delta F508$, ni entre el resto de mutaciones. Esto se puede deber, además de al bajo número de sujetos incluidos, a que todas las mutaciones de los pacientes del estudio estén relacionadas con un alto grado de afectación pulmonar (214). En este sentido el análisis estratificado no mostró diferencias entre el grado de afectación pulmonar y la mutación responsable entre los participantes en el momento del estudio. No se encontró tampoco asociación entre la composición del microbioma y variables como el género y la existencia o no de hermanos convivientes. Se ha planteado si algunas variables del huésped y del entorno pueden influir en el microbioma de las vías respiratorias (232). En nuestro estudio no se han encontrado diferencias, pero posiblemente se deba estudiar la influencia de estas variables en la composición del microbioma con estudios que incluyan un mayor número de sujetos y también en estudios intercéntricos e incluso internacionales (160).

6.4.5.2. Tratamiento antibiótico

Los tratamientos antibióticos sistémicos, administrados de forma repetida, pueden disminuir la diversidad de las comunidades bacterianas en pacientes con FQ (233,190). En estudios longitudinales (168) se ha determinado que la estructura de las comunidades bacterianas, previas al tratamiento antibiótico sistémico, se restablecen al mes de suspendido el tratamiento, aunque el grado de recuperación depende de la diversidad previa. Otros autores (225) sugieren que el tratamiento antibiótico puede perturbar el microbioma con una disminución de la carga bacteriana, que favorece un incremento de la cantidad absoluta y relativa de *Pseudomonas aeruginosa*, por reemplazamiento de las especies eliminadas con el antibiótico, en especial con tratamientos prolongados e intravenosos. En nuestro estudio no se encontraron diferencias en la composición del microbioma en función del tratamiento antibiótico nebulizado. Hay que considerar que la mayoría de los pacientes (77%) de nuestro estudio estaban recibiendo tratamientos nebulizados, con distintas combinaciones antibióticas, por lo que es difícil establecer comparaciones. Sería interesante desarrollar estudios que permitan ver la influencia de la

antibioterapia nebulizada y sistémica previa y posterior, con respecto a la composición del microbioma. Otra variable a tener en cuenta es el uso intermitente que se hace de los macrólidos en la FQ, tanto por su efecto antibiótico como inmunomodulador (234). En nuestro caso, tres cuartas partes de los pacientes tomaban macrólidos de forma intermitente y no se han encontrado diferencias en la composición del microbioma entre estos pacientes que lo tomaban y los que no. Aunque hay estudios sobre su papel regulador en las relaciones de *Quorum Sensing* entre especies (235), no se han desarrollado estudios diseñados para conocer el impacto de la terapia mantenida con macrólidos en el microbioma de los pacientes con FQ.

Una mayor comprensión del microbioma puede influir en una mejor elección del antibiótico en las exacerbaciones, la vía y la duración del tratamiento (233) así como de los tratamientos periódicos, y puede esclarecer la repercusión que dicha intervención tiene sobre el microbioma y el individuo.

6.4.5.3. Antecedentes de infección por *Pseudomonas aeruginosa*

Como se ha comentado, los pacientes del estudio se caracterizan por una alta prevalencia de colonización por *Staphylococcus aureus*, y una menor prevalencia (46%) de colonización por *Pseudomonas aeruginosa*. Resulta llamativo que mediante secuenciación masiva sólo se pudiera detectar el género *Pseudomonas spp* en dos pacientes. Una posibilidad es que se tratara de secuencias incompletas no detectadas, o completas con una frecuencia relativa baja que resultara indetectable frente a otros gémenes más abundantes y no cultivables. Además, puede haber distintos nichos que actúen como reservorio para la reinfección y la colonización intermitente (35), por lo que un estudio transversal de una única muestra, sin estudio selectivo específico para *P. aeruginosa*, puede no detectar esta bacteria. En un estudio en paralelo de cultivo y secuenciación masiva realizado con muestras de lavado broncoalveolar en niños con FQ y casos control, también se detectó *P. aeruginosa* sólo en el cultivo y no en la secuenciación (185). Otros estudios sobre muestras respiratorias de pacientes con EPOC también señalan que el cultivo magnifica la presencia de bacilos Gram negativos y se detectan en pacientes con baja carga real, cuando se estudia por técnicas de secuenciación masiva (152).

El antecedente de colonización no influyó en la composición del microbioma. Hay que destacar que tampoco se encontró asociación aparente en la afectación pulmonar o el antecedente del número de exacerbaciones entre pacientes colonizados y los no colonizados por *P. aeruginosa*. En el período de edad de la mayoría de los pacientes incluidos, en muchos casos *P. aeruginosa* no es todavía el germen dominante, ni tampoco responsable de la neumopatía, como acontece con posterioridad (236). En estudios de secuenciación masiva realizados sobre piezas quirúrgicas de tejido pulmonar de niños con FQ y afectación pulmonar (237), la composición de la microbiota era cualitativa y anatómicamente heterogénea, y no estaba dominada por los patógenos tradicionales, como *P. aeruginosa*. Aunque este microorganismo es considerado el más relevante en la historia clínica de la enfermedad, no forma parte de los géneros con mayor frecuencia absoluta y relativa y que de forma consistente integran el denominado microbioma core en pacientes adultos con FQ (142), en los que la colonización crónica por *P. aeruginosa* suele estar ya presente. Aunque todos estos conceptos tienen que ser reevaluados con el nuevo estado de los conocimientos establecido por las técnicas de estudio del microbioma (238).

6.5.- Relaciones entre las comunidades que integran el microbioma en la fibrosis quística

El desarrollo de los cultivos más complejos y métodos moleculares han demostrado que la infección pulmonar de la FQ es polimicrobiana, y que el tipo y cantidad de bacterias presentes en las muestras respiratorias puede diferir entre los individuos y en el tiempo (66). La detección de bacterias inesperadas por métodos no dependientes de cultivo, como el *Streptococcus milleri*, puede explicar la inflamación de las vías respiratorias y el deterioro progresivo sin la presencia de patógenos (170). También la alteración en la composición de las comunidades e interrelación entre los patógenos clásicos puede explicar situaciones de inestabilidad y deterioro clínico (188).

6.5.1. Disbiosis

La alteración de cualquiera de las relaciones recíprocas a través de los cambios en la composición de la comunidad microbiana, es decir, **disbiosis**, podría contribuir a la aparición de la enfermedad o influir en su evolución. Recientes aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva han revelado disbiosis asociadas con diversas situaciones de enfermedad (133), incluyendo la diarrea asociada a antibióticos, la vaginosis bacteriana, la enfermedad celíaca, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, el síndrome de intestino irritable, la enterocolitis necrotizante, la obesidad y la psoriasis. Esta situación también ha sido descrita en FQ, tanto a nivel digestivo (239) como respiratorio (232).

La aplicación de la metagenómica ha proporcionado la hipótesis de que la interrupción de los equilibrios ecológicos de las comunidades en el pulmón, la pérdida del mutualismo y la aparición de especies competidoras podrían ser determinantes de una variedad de patologías respiratorias, como la FQ (173). No obstante, este modelo explicativo tiene que ser mejor delimitado, dado que aún no se ha podido determinar situaciones de disbiosis asociadas a la enfermedad que claramente cumplan los criterios de causalidad (240), ni tampoco se ha podido encontrar un biomarcador del microbioma que determine la evolución clínica (241).

6.5.2. La presencia de bacterias inesperadas puede explicar la inflamación y deterioro pulmonar sin la presencia de patógenos considerados clásicos

Los estudios de secuenciación masiva han puesto de manifiesto la existencia de comunidades bacterianas con ausencia o escasa participación de los considerados patógenos clásicos. La detección mediante técnicas de secuenciación masiva, de gérmenes no cultivables o no considerados relevantes, pone de manifiesto la fisiopatología de las exacerbaciones con cultivo tradicional negativo (242). En un estudio que empleaba una perspectiva polimicrobiana de la infección pulmonar en FQ (170), el grupo de *Streptococcus milleri*, un grupo fenotípicamente variable asociado a la flora comensal,

estaba asociado a la infección pulmonar crónica y a la exacerbación, muchas veces infradiagnosticada por las técnicas de cultivo. En otros, *Gemella spp* parece jugar un papel directo en las exacerbaciones, con incrementos significativos en su abundancia y remodelando la microbiota de las vías respiratorias (169).

En nuestro estudio se observó una peor función pulmonar en los pacientes con un patrón de microbiota con mayor frecuencia de *Staphylococcus spp*, frente a otros dos grupos con mayor densidad de *Actinomyces spp* y *Streptococcus spp*. No se pudo encontrar asociación entre los distintos gérmenes y los antecedentes de exacerbación, dado la heterogeneidad de los resultados del microbioma obtenido en cada paciente. Lo que sí se puso de manifiesto es que *Pseudomonas aeruginosa* no se detectó en la mayoría de pacientes con antecedentes de exacerbación, y que la mitad de los pacientes con historia previa de exacerbaciones no tenía antecedentes de infección por este microorganismo, lo que recalca la participación de otros gérmenes. No obstante, otros autores (133) consideran que más que el descubrimiento de patógenos desconocidos, la aplicación de la metagenómica al estudio de la salud humana, permite ver que es la disrupción de los equilibrios latentes entre las comunidades bacterianas que integran el microbioma, la que pone en marcha la enfermedad a través de gérmenes que por sí mismos no son considerados patógenos.

6.5.3. Relación entre patógenos: *Staphylococcus aureus* meticilin sensible y *Pseudomonas aeruginosa*

Con el estado actual de los conocimientos (243), la erradicación sistemática de *Staphylococcus aureus* meticilin sensible (SAMS) en pacientes con FQ resulta controvertida. Datos del registro de la *Cystic Fibrosis Foundation* muestran que la colonización por SAMS reduce el deterioro de la FEV1 y presenta una tasa de mortalidad menor (244). Los datos de este estudio sugieren que SAMS y *P. aeruginosa* tienen una fuerte relación antagónica entre ellos, reduciendo la tasa de adquisición e incrementando la pérdida del otro. En otro estudio, en el que se realizaba la comparación de microbiomas de pacientes con distintos grados de afectación pulmonar (245), la presencia *S. aureus* era más abundante en

pacientes con enfermedad leve que en formas graves de enfermedad, en las que predominaba *P. aeruginosa*. Éste puede ser uno de los motivos que expliquen el porqué los pacientes de nuestro estudio, en más de un 90% eran portadores crónicos de *S. aureus* determinados por cultivo, y con una alta frecuencia absoluta de este microorganismo, presentasen a su vez una baja concentración de *Pseudomonas spp* en su microbioma, tan sólo detectable en dos casos. Más de la mitad de los pacientes eran portadores de *Pseudomonas spp* determinados por cultivo tradicional. Este método clásico es selectivo, dirigido a favorecer y aislar a especies de interés patológico, frente a otras especies no viables en cultivo, pudiendo esto deformar los predominios de bacterias en las muestras. Un dato a favor a esta asociación inversa es la observación de que los tratamientos profilácticos para evitar la colonización por *S. aureus* pueden incrementar la incidencia y prevalencia de infección por *P. aeruginosa* (246).

Progresivamente, en especial al inicio de la edad adulta, en la composición del microbioma de los pacientes con FQ se incrementa la cantidad de *P. aeruginosa*, con una tendencia a imponerse sobre al resto de especies, y una disminución de la cantidad de *Staphylococcus spp*, fruto de la relación antagonista entre los dos géneros (244).

6.5.4. Papel de los gérmenes anaerobios integrantes en el microbioma

Con el desarrollo de las nuevas técnicas se ha observado la abundante presencia de anaerobios estrictos en las vías respiratorias inferiores de los pacientes con FQ, independientemente de la edad y la muestra empleada (incluidos el lavado broncopulmonar, la biopsia abierta y el estudio de explantes). El papel que juegan este tipo de bacterias está pobremente definido (189) y se desconoce si se tratan de patógenos comensales inofensivos, o bien confieren cierto factor protector frente a infecciones por patógenos clásicos. Por una parte, algunos anaerobios se asocian a una mejor situación clínica con mayor diversidad de bacterias, como la presencia de *Prevotella spp* que se asocia con una mejor función pulmonar, y con menor cantidad de marcadores de inflamación (242). La reducción del número de colonias de bacterias anaeróbicas se asocia con un empeoramiento del índice de aclaramiento pulmonar y de los parámetros inflamatorios en FQ (247).

En contraste, otras especies anaerobias se han relacionado con exacerbaciones en población adulta (248). También, aunque no sean patógenos por sí mismos, los organismos anaeróbicos pueden influir en el comportamiento de otras especies, estimulando o inhibiendo factores de virulencia (249), o produciendo mecanismos de resistencia bacteriana, como β -lactamasas (177). Todos estos fenómenos contribuyen indirectamente al incremento de la resistencia de la microbiota de la FQ y al fracaso de la terapia antibiótica.

En nuestro estudio se encuentran varias especies de anaerobios estrictos y aerotolerantes: *Veillonella spp*, *Prevotella spp*, *Actinomyces spp*, *Atopobium spp*, *Bifidobacterium spp*... todos ellos descritos en las vías respiratorias de pacientes con FQ (250), y algunas de ellas con menor frecuencia relativa que en otros estudios (162), aunque hay mucha variabilidad en los resultados cuantitativos publicados (141,147,167,251).

6.6.- Aplicación de la metagenómica en la asistencia de pacientes con fibrosis quística

Para que la investigación del microbioma de las vías respiratorias en pacientes con FQ pueda ser de utilidad en la práctica clínica, se ha de dar respuesta a dos cuestiones fundamentales todavía no esclarecidas. Por una parte se ha de demostrar que los cambios observados en el microbioma son causa probada de enfermedad o contribuyen en su fisiopatología. Además, se ha de determinar de qué forma se puede intervenir sobre el microbioma de una comunidad para producir un objetivo terapéutico deseado (176,252).

6.6.1. Estudio del microbioma para determinar la evolución de la enfermedad y la respuesta a intervenciones

Los estudios de la microbiota de pacientes con FQ, en vez de reflejar los resultados obtenidos por los medios de cultivo habituales, han puesto de manifiesto un alto número de especies indetectables con la metodología microbiológica convencional. Entre las

especies se encuentran un alto número de especies anaerobias, que han obligado a reconsiderar su potencial contribución en la infección pulmonar crónica (162,223).

El desarrollo de la metagenómica puede cambiar los principios tradicionales de causalidad microbiológica basados en los postulados de Koch (253). En determinados escenarios como la FQ, más que por la presencia de un patógeno particular, la infección se produce por la interacción de un grupo de especies (223). Por otra parte, tan importante como conocer la existencia de un microorganismo, es determinar su actividad en ese ecosistema, mediante el estudio de sus factores de virulencia y patogeneidad, mediante el estudio de transcripción genética (transcriptómica), producción de proteínas (proteómica), la actividad metabólica (metabolómica) y los mecanismo de resistencia antibiótica de las comunidades bacterianas (resistoma).

Frente al cultivo tradicional, las técnicas metagenómicas no pueden ofrecer el patrón de sensibilidad antibiótica *in vitro* de un microorganismo aislado. No obstante, la definición tradicional de resistencia *in vitro*, basada en la concentración mínima inhibitoria en antibióticos administrados vía parenteral (254), puede ser no apropiada en un escenario como la infección pulmonar en FQ, donde la infección suele ser crónica, polimicrobiana y los antibióticos son administrados por vía nebulizada. Además, la misma muestra en un aislamiento de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ puede mostrar distintos perfiles de susceptibilidad antibiótica (255), y no siempre hay correlación entre la sensibilidad antibiótica *in vitro* y la respuesta antibiótica en pacientes crónicamente infectados por *P. aeruginosa* (256).

Con las técnicas metagenómicas se puede determinar el efecto global de una intervención como la antibioterapia sobre el conjunto de comunidades del microbioma de un individuo. Se puede determinar si la microbiota es resistente (insensibilidad al cambio), o resiliente (grado de recuperación tras una agresión), lo que puede ayudar a planificar futuras intervenciones y planificar tratamientos (158). Sin embargo, en un ensayo clínico no se encontraron diferencias en el curso clínico cuando se empleó a la hora de elegir tratamiento un modelo para determinar la sensibilidad antibiótica global del biofilm frente al estudio planctónico del antibiograma (257).

La aproximación a los mecanismos de resistencia del microbioma (resistoma) mediante técnicas moleculares, de forma individual o en combinación con técnicas de cultivo, puede

ayudar a determinar la respuesta a tratamientos antibióticos. De forma aislada, se ha podido predecir la expresión de resistencia antibiótica, mediante la detección de dianas específicas, como el *mecA*, asociado con SAMR (258). En nuestro estudio, la aplicación de una sonda para detectar el gen *mecA* a todos los pacientes mostró la misma sensibilidad y especificidad que los métodos de detección fenotípicos, detectando al único portador de SAMR.

Algunos parámetros de los estudios ecológicos de las comunidades bacterianas en las vías respiratorias pueden ser relevantes como marcadores evolutivos de la enfermedad. En nuestro estudio, el hallazgo de un microbioma con escasa diversidad, dominado por *Staphylococcus spp* y con menor cantidad de otros géneros presentes en el microbioma de pacientes sin FQ, se asocia a una peor función pulmonar, sin que esta observación guarde relación aparente con otras variables clínicas. El creciente número de estudios que evalúan enfermedades respiratorias con el microbioma, muestra de forma consistente una relación inversa entre la diversidad de especies y la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, tiene que determinarse mejor si se trata de una relación causal (el sobrecrecimiento de un patógeno disminuye la diversidad con una repercusión negativa en la evolución), o es sencillamente una manifestación colateral de un mayor presión antibiótica por evolución desfavorable de la enfermedad, que reduce colateralmente el número y diversidad de especies. El desarrollo de futuros estudios prospectivos, debidamente aleatorizados que evalúen comparativamente el efecto de distintos protocolos antibióticos en situaciones clínicas similares podrá esclarecer esta observación. También se ha planteado la utilidad de pruebas funcionales para conocer la respuesta del microbioma del paciente frente a intervenciones como el tratamiento antibiótico o la administración de probióticos (252).

El uso combinado de técnicas metagenómicas con el cultivo tradicional en Microbiología Clínica ha resultado útil para monitorizar infecciones polimicrobianas en pacientes con FQ (116). Con esta combinación, los autores pudieron predecir la adquisición de resistencias antibióticas por parte de la comunidad bacteriana frente a distintas pautas de tratamiento, lo que puede constituir una información clínica relevante.

6.6.2. Herramientas terapéuticas

El objetivo de las terapias dirigidas a la microbiota es la recuperación de la homeostasis existente en las comunidades bacterianas existente en estados de salud. Este modelo de pérdida del equilibrio se aplica en patologías donde la relación entre la alteración de la microbiota habitual y la enfermedad está bien definida, como en la colitis pseudomembranosa por *C. difficile* (117), enfermedad en la que se ha empleado como terapia el trasplante de microbiota fecal. Los avances en metagenómica han relevado un entramado de comunidades bacterianas que integran un complejo ecosistema. Se ha planteado si un modelo basado en una perspectiva ecológica (156) pueda llevarse a cabo, mediante antibioterapia específicamente dirigida a microorganismos, modificación de factores necesarios para el crecimiento (259) y modificación de las interacciones entre especies (260).

6.6.2.1. Antibioterapia dirigida

Las líneas de tratamiento actuales en FQ comprenden la antibioterapia de amplio espectro dirigida a minimizar la carga bacteriana y la respuesta inmune del huésped. Los tratamientos antibióticos son posteriormente ajustados por el aislamiento de microorganismos individuales en el cultivo y su antibiograma. Pese a que estos tratamientos antibióticos tienen un efecto positivo a largo plazo, progresivamente la erradicación de las poblaciones bacterianas patogénicas resulta más difícil. Por un lado, se producen cambios estructurales y procesos de remodelación en las vías aéreas que crean nichos ecológicos de difícil acceso para los antimicrobianos, y además a largo plazo, se produce una selección de gérmenes resistentes. Estos cambios repercuten en la diversidad bacteriana y estabilidad de las comunidades (261). Por otra parte, dada la naturaleza polimicrobiana de la infección pulmonar en FQ, la antibioterapia dirigida contra un pequeño número de organismos reconocidos como patógenos clásicos en FQ puede ser inefectiva cuando están presentes especies atípicas (262).

El efecto colateral de la antibioterapia conlleva la perturbación de las comunidades bacterianas integradas en el organismo y el efecto indeseable de la pérdida de flora comensal beneficiosa para el huésped. Por eso, como se aboga en cada vez más patologías, el clínico debe emplear antibioterapias de espectro más estrecho, dirigidas a los gérmenes patógenos, guiadas por antibiogramas y detección de genes de susceptibilidad mediante estudios de biología molecular. Sin embargo, este modelo puede ser fácilmente aplicable a infecciones agudas en población sana, normalmente monomicrobianas como infección del tracto urinario, pero resulta complicado en un escenario como la infección crónica polimicrobiana en la FQ. Además, la eliminación selectiva, de una forma “quirúrgica” sin afectar a especies no patógenas de similares características no es viable en la mayoría de ocasiones (263).

6.6.2.2. Modificación del microbioma

Entre las intervenciones propuestas para erradicar determinadas bacterias patógenas y modificar el microbioma se encuentra la utilización de virus bacteriófagos (264). Estos son virus predadores selectivos que se han aislado en varias localizaciones, incluidas las vías respiratorias. Sin embargo no se han localizado en el biofilm generado por bacterias, en especial por *Pseudomonas aeruginosa* de las vías respiratorias de individuos con FQ. Este biofilm puede actuar como un mecanismo protector, no sólo frente antibióticos, sino también frente virus bacteriófagos.

Otro tipo de intervenciones sobre el microbioma intestinal de pacientes con FQ en edad temprana, como la lactancia materna prolongada y el uso de probióticos, pueden influir en la colonización de las vías respiratorias por *P. aeruginosa* y la aparición de exacerbaciones respiratorias (148,200). Los probióticos, muchas veces no logran cambiar la composición del microbioma, pero sí consiguen cierto efecto al modular determinadas funciones de las especies que integra el microbioma en otros escenarios clínicos (265).

6.6.2.3. Disminución de las resistencias bacterianas

Los regímenes de tratamiento con antibióticos dirigidos a agentes patógenos reconocidos han contribuido en gran medida al aumento de la esperanza de vida de los pacientes con FQ. Este avance se ha acompañado de la aparición de resistencias a antibióticos y selección de cepas bacterianas multirresistentes, no sólo en los patógenos reconocidos, sino en otras bacterias de la microbiota, como *Prevotella spp* y *Streptococcus spp*, con un papel incierto en la fisiopatología de la infección e inflamación pulmonar.

El incremento de la resistencia a los antibióticos en la FQ, además de la amplia y prolongada utilización de antibióticos y la mayor esperanza de vida de los pacientes, puede atribuirse a una serie de factores complejos, incluyendo la transferencia horizontal de genes, la hipoxia existente en tejidos afectados por la destrucción pulmonar, la concentración subterapéutica de antibióticos en los tejidos diana y la formación de biopelículas (266).

Entre las estrategias empleadas para gestionar la resistencia antibiótica se encuentran la administración localizada de los antimicrobianos, el desarrollo de nuevos agentes, el secuestro de hierro (267), la inhibición de los mecanismos de *quorum sensing* (49) y el análisis de los genes de resistencia antibiótica de la microbiota (resistoma) (266). Determinar la contribución de todas las especies bacterianas para la salud o la enfermedad pulmonar en la FQ también podría tener un papel importante en la gestión de la resistencia a los antibióticos.

6.7.- Limitaciones del estudio

6.7.1. Por el diseño de investigación y el tipo de estudio elegido

La realización de un estudio transversal, sin grupo control, pudo generar una serie de limitaciones inherentes. Aunque estos estudios resultan útiles para formular hipótesis, no sirven para evaluar o testar la presencia de una asociación estadística. La presencia de una

asociación puede ser un hecho casual. Otra limitación de nuestro estudio fue la ausencia de un grupo control contemporáneo con pacientes sin FQ, bien población sana o pacientes con otra patología respiratoria. El grupo control ideal sería el de pacientes sanos, pero tiene la dificultad de la obtención de la muestra y el coste económico.

Los resultados podían verse afectados por variables confundientes, como los antecedentes de antibioterapia previa, el genotipo o los antecedentes de exacerbación, a la hora de estudiar la asociación entre diversidad bacteriana y función pulmonar. El estudio estratificado por los grupos de estas posibles variables de confusión y la estimación de riesgo ajustado redujo la importancia de este posible sesgo.

No se pudo seguir de forma longitudinal la evolución del microbioma de los pacientes, lo que podía resultar útil para conocer la evolución del microbioma a lo largo de la enfermedad y para determinar la respuesta a las intervenciones terapéuticas. No obstante, se generó una colección en el Biobanco para poder realizar el seguimiento de los pacientes en futuros estudios.

6.7.2. Por el número de pacientes

Reconocemos que el número de pacientes incluidos en el estudio no es alto, pero resulta similar o superior al de otros estudios incluidos en la bibliografía que analizan el microbioma de sujetos con FQ (148,158,190,197,199,228,237,268). Este bajo número de sujetos limita la potencia, y puede que algunas asociaciones fueran estadísticamente más significativas si se hubiera incluido una cantidad superior de pacientes. El limitado número de sujetos puede implicar una baja representatividad de la población diana. Nuestro estudio comprende un grupo bastante delimitado de edad, que no incluye pacientes en edad adulta, como sucede en otros estudios (169,174,186,190,242). El bajo número no fue una limitación para que se constituyesen grupos homogéneos para estudios comparativos.

6.7.3. Por el tipo de muestra elegida

El efecto de la heterogeneidad de la composición de la muestra, tanto temporal como espacial, debe ser considerado. Por ejemplo, dos muestras de esputo recogidas consecutivamente pueden variar considerablemente en su composición, lo que es una limitación a tener en cuenta en estudios transversales como el nuestro.

6.7.4. Por la técnica empleada

Los estudios de secuenciación no tienen la misma sensibilidad para la detección de todos los géneros, y en nuestro caso, ante la cantidad desigual de material genético obtenido, se pudo determinar el género, no la especie, salvo en *Staphylococcus spp*, lo que impidió diferenciar microorganismos patógenos de microorganismos comensales sin relevancia, como por ejemplo los integrantes del grupo del *Streptococcus milleri*, del resto de especies del grupo.

El método de preparación del DNA de la muestra tiene que ser considerado a la hora de interpretar cuantitativamente la presencia de *Staphylococcus spp* (269). Con los métodos estándar se obtienen una menor abundancia relativa de *Staphylococcus spp* que con métodos de lisis modificados con adición de lisostapina-lisozima, en el que se obtiene una abundancia relativa significativamente mayor, repercutiendo en la diversidad alfa de toda la muestra. En nuestro estudio se empleó **MolYsis** un sistema de lisis selectiva, que degrada el DNA humano no objetivo, por lo que aumenta la sensibilidad y especificidad en el estudio de DNA bacteriano. No obstante, es relevante señalar que en muestras ricas en *Staphylococcus spp*, como es el caso de nuestro estudio (12 de 13 colonizados por *S. aureus*), los análisis del microbioma realizados con los distintos sistemas de lisis presentan una alta correlación (269).

También es relevante el número de secuencias que no se pudo asignar, un 42% del total de las secuencias, lo que pudo influir en la precisión de los resultados obtenidos, distorsionando la composición del microbioma, y afectado las frecuencias absolutas y relativas de sus integrantes.

6.7.5. Por no haber realizado cultivo paralelo ni técnicas específicas moleculares para determinar *Pseudomonas aeruginosa*

No se realizó un cultivo paralelo con la muestra de esputo de los pacientes, dada la limitada cantidad de muestra. La prevalencia de colonización o infección se realizó mediante el registro histórico de cada paciente de los sucesivos cultivos microbiológicos, lo que no permite determinar la correlación transversal de los hallazgos del estudio metagenómico con los del cultivo en el momento del estudio.

La prevalencia de colonización crónica por *P. aeruginosa* en la muestra de nuestro estudio es relativamente baja, y sólo se detectó *P. aeruginosa* en el estudio metagenómico de la mitad de los pacientes previamente colonizados, como en otros estudios de las mismas características (157). Nuestro análisis no fue diseñado para evaluar el impacto que la OTU, con muy baja abundancia relativa pero alta relevancia clínica, puede tener sobre la biología de la vía aérea, sino más bien para evaluar el conjunto del microbioma en un grupo de pacientes con distintas variantes clínicas. No se empleó una técnica específica para detectar la presencia de *P. aeruginosa* en las muestras estudiadas lo que pudo implicar el infradiagnóstico de esta especie.

Por este motivo, estaría justificado el desarrollo de nuevos trabajos que ayudaran a determinar la composición, cambios y equilibrios de las comunidades bacterianas de las vías respiratorias en población pediátrica con FQ y su relación con otras variables de la enfermedad, para consolidar el conocimiento global de la evolución de la microbiota respiratoria en estos pacientes.

6.8.- Futuras preguntas de investigación

6.8.1. Sobre la evolución dinámica de las comunidades bacterianas de las vías respiratorias a largo plazo

¿Cuál es la relación causal entre la disminución de la diversidad de la comunidad bacteriana y la progresión de la enfermedad pulmonar? ¿Cuáles son los desencadenantes de esta pérdida de diversidad?

Una mayor diversidad de comunidades bacterianas, ¿genera un impacto positivo en la evolución pulmonar del paciente? Si fuera así, ¿qué opciones de tratamiento existirían para lograr un microbioma asociado a estados de salud?

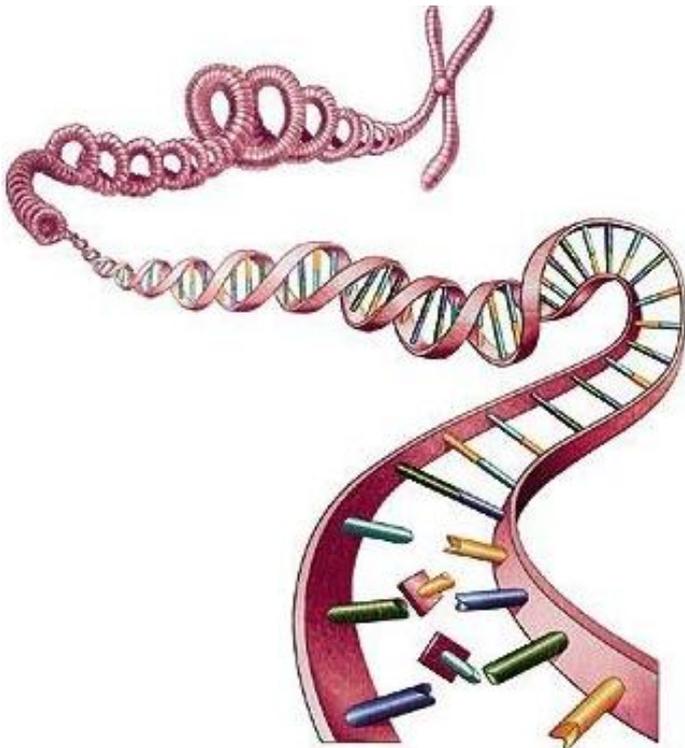
6.8.2. Sobre la evolución dinámica de las comunidades bacterianas de las vías respiratorias a corto plazo

¿Hay cambios detectables en la estructura y/o actividad de las comunidades bacterianas que estén asociados con cambios en el estado clínico?

¿Se pueden identificar biomarcadores del microbioma asociados a una exacerbación inminente? Si es así, ¿pueden éstos ser monitorizados en tiempo real y empleados para evitar la exacerbación?

6.8.3. Sobre el papel que juegan los anaerobios en las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística

¿Cuál es su papel en la progresión de la enfermedad pulmonar? ¿La terapia antibiótica dirigida contra especies anaerobias puede mejorar el tratamiento de los episodios de exacerbación o disminuir a largo plazo la diversidad de la microbiota bacteriana?



CONCLUSIONES

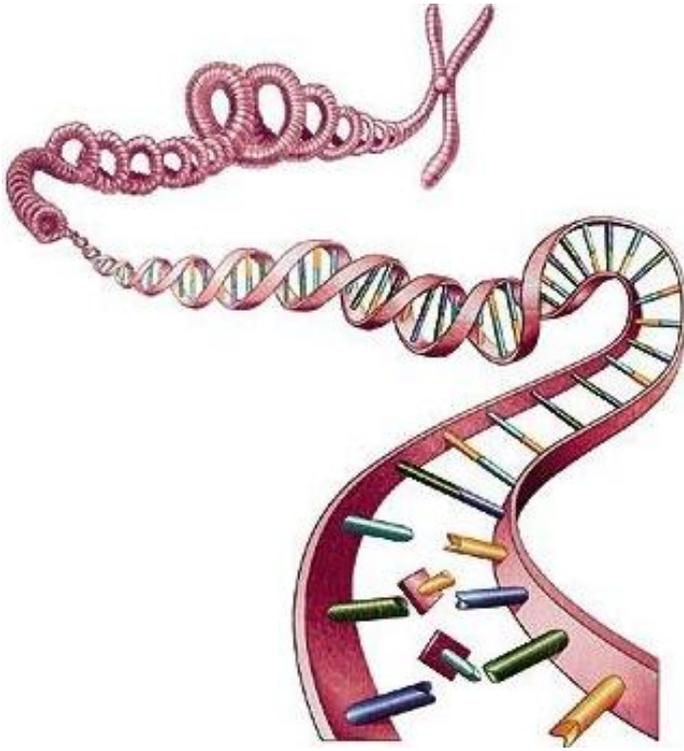


7. CONCLUSIONES

- Las nuevas técnicas de microbiología molecular proporcionan una gran cantidad de información que ha de ser debidamente integrada en el conocimiento global de la FQ.
- Los avances en microbiología molecular han puesto de manifiesto que el microbioma pulmonar en la FQ, en relación a los tipos y abundancia bacteriana, presenta variabilidad interindividual y en los distintos estadios de enfermedad.
- El análisis por secuenciación masiva mostró la presencia de bacterias anaerobias, particularmente *Veillonella spp* y *Prevotella spp*, así como otros microorganismos que difícilmente se aíslan en los cultivos tradicionales de los pacientes con FQ.
- Existe una relación entre la diversidad bacteriana y el estadio de la enfermedad, coincidente con otros estudios sobre FQ y otras enfermedades respiratorias.
- Se detectó la presencia de un gran número de secuencias de *Staphylococcus spp*, en correlación con los estudios microbiológicos convencionales. Su mayor número parece relacionarse con una menor diversidad y mayor afectación respiratoria.
- Hay una relación inversamente proporcional entre la diversidad bacteriana y el deterioro de la función respiratoria expresado por la FEV1.
- El hallazgo de un microbioma con escasa diversidad, dominado por *Staphylococcus spp* y con menor cantidad de otros géneros presentes en el microbioma de pacientes sin FQ, se asocia a una peor función pulmonar, sin que esta observación guarde relación aparente con otras variables clínicas.
- *Staphylococcus aureus* meticilin sensible y *Pseudomonas aeruginosa* tienen una fuerte relación antagónica en el microbioma de pacientes con FQ, reduciendo cada uno de ellos la tasa de adquisición e incrementando la pérdida del otro, lo que explicaría el bajo número de *P. aeruginosa* y alto número de *Staphylococcus spp* en los microbiomas de nuestro estudio.

- Para que las técnicas que estudian el microbioma tengan aplicación en la práctica clínica se tiene que establecer con claridad la relación causal entre los cambios en el microbioma y la evolución de la enfermedad, y si es posible, ofrecer datos que permitan realizar intervenciones sobre el microbioma que tengan repercusión en la evolución clínica.





REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Barrio Gómez de Agüero MI, García Hernández G, Gartner S. Grupo de Trabajo de Fibrosis Quística. Protocolo de diagnóstico y seguimiento de los pacientes con fibrosis quística. An Pediatr (Barc). 2009;71:250–64
2. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic Fibrosis. N Engl J Med. 2005; 12;352: 1992–2001
3. Lucarelli M, Bruno SM, Pierandrei S, Ferraguti G, Stamato A, Narzi F, et al. A Genotypic-Oriented View of CFTR Genetics Highlights Specific Mutational Patterns Underlying Clinical Macrocategories of Cystic Fibrosis. Mol Med 2015; 21: 257–75
4. Castro HE, Aguirre AS, Ortega DG, María J, Ortega N. Fibrosis quística. Protoc diagnóstico-terapéuticos Gastroenterol Hepatol y Nutr Pediátrica SEGHNPAEP. 2009; 77–84
5. Hurley MN, McKeever TM, Prayle AP, Fogarty AW, Smyth AR. Rate of improvement of CF life expectancy exceeds that of general population—Observational death registration study. J Cyst Fibros. J Cyst Fibros. 2014;13:410-5
6. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. State of the Art Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. 2003;168:918–51
7. Rosenfeld M, Gibson RL, Mcnamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, et al. Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2015;32:356–66
8. Buzzetti R, Salvatore D, Baldo E, Forneris MP, Lucidi V, Manunza D, et al. An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 1. Mortality and survival studies in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2009;8:229–37
9. Wolfenden LL, Schechter MS. Genetic and non-genetic determinants of outcomes in cystic fibrosis. Paediatr Respir Rev. 2009;10:32–6
10. Salcedo A, Gartner S, Girón RM, Girón MD, editores. Tratado de Fibrosis Quística. Madrid: Ed. Justim; 2012
11. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. Trends Mol Med; 2007;13: 231–40
12. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. Cell. 1996;85:229–36
13. Breu F, Guggenbichler S, Wollmann J. Editores. Los tres pilares de tratamiento en fibrosis quística. Valencia. Edita: Federación Española contra la Fibrosis Quística. 2008;78–84
14. de Vrankrijker AMM, Wolfs TFW, van der EK. Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. Paediatric Respiratory Reviews. 2010
15. Cantón R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, et al. Tratamiento antimicrobiano frente a la colonización pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* en el paciente con fibrosis quística. Arch Bronconeumol. 2005;41:1-25
16. Kosorok MR, Zeng L, West SEH, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A, et al. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. Pediatr Pulmonol. 2001;32:277-87

17. Lay-son G, Repetto DG. Genética y fibrosis quística : Desde el gen CFTR a los factores modificadores. *Neumol Pediatr* 2010; 5: 4-9
18. Geborek A, Hjelte L. Association between genotype and pulmonary phenotype in cystic fibrosis patients with severe mutations *Cyst Fibros*. 2011; 10:187-92
19. Knowles MR, Drumm M. The Influence of Genetics on Cystic Fibrosis Phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 1:1-13
20. Stuart B, Lin JH, Mogayzel PJ. Early eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2010;11:177-84
21. Saiman L. Microbiology of early CF lung disease. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5 Suppl A:S367-9
22. Hayes D, West SE, Rock MJ, Li Z, Splaingard ML, Farrell PM. *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis diagnosed through newborn screening: Assessment of clinic exposures and microbial genotypes. *Pediatric pulmonology*. 2010;45:708-716
23. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 2001;183:444-52
24. Munck A, Bonacorsi S, Mariani-Kurkdjian P, Lebourgeois M, Gérardin M, Brahim N, et al. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. *Pediatr Pulmonol*. 2001;32: 288–92
25. Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, et al. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun*. 2007;75: 2214-24
26. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, et al. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros*. 2012;11:363-82
27. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*. 2015;14:419-30
28. Hogardt M, Heesemann J. Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;358:91-118
29. Qin X, Zerr DM, McNutt MA, Berry JE, Burns JL, Kapur RP. *Pseudomonas aeruginosa* syntrophy in chronically colonized airways of cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:5971-81
30. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA*. 2005 ;293:581-8
31. Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, Montanaro P, Canigia LF, Argaraña CE, Smania AM. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS One*. 2010;5:e12669

32. Davies JC, Bilton D. Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis. *Respir Care*. 2009;54:628–40
33. Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Current and future strategies. *J Cyst Fibros. European Cystic Fibrosis Society.*; 2012;11:461–79
34. Schelstraete P, Haerynck F, Van daele S, Deseyne S, De Baets F. Eradication therapy for *Pseudomonas aeruginosa* colonization episodes in cystic fibrosis patients not chronically colonized by *P. aeruginosa*. *J Cyst Fibros*. 2013;12:1-8
35. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* . 2012;10:841–51
36. Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr*. 2007;19:83-8
37. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* . 2002;34: 634–40
38. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:582–610
39. Lutz L, Leão RS, Ferreira AG, Pereira DC, Raupp C, Pitt T, et al. Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients from Two Brazilian Cities. *J Clin Microbiol* . 2013;51:927–30
40. Kenna DT, Doherty CJ, Foweraker J, Macaskill L, Barcus V a., Govan JRW. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology*. 2007;153:1852–9
41. Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27:89–104
42. Farrell PM, Govan JR. *Pseudomonas* serology: confusion, controversy, and challenges. *Thorax*. 2006;61:645-7
43. Hayes D, Farrell PM, Li Z, West SE. *Pseudomonas aeruginosa* serological analysis in young children with cystic fibrosis diagnosed through newborn screening. *Pediatr Pulmonol*;45:55–61
44. Deschaght P, Van Daele S, De Baets F, Vanechoutte M. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *J Cyst Fibros*; 2011;10:293–7
45. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TFW. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*; 2005;4 Suppl 2: 37–43
46. Cantón R, Máiz L, Escribano A, Oliveira C, Oliver A, Asensio O, et al. Consenso español para la prevención y el tratamiento de la infección bronquial por *Pseudomonas aeruginosa* en el paciente con fibrosis quística. *Arch Bronconeumol*; 2015;51:140–50

47. Salipante SJ, Sengupta DJ, Rosenthal C et al. Rapid 16S rRNA next-generation sequencing of polymicrobial clinical samples for diagnosis of complex bacterial infections. *PLoS One*. 2013;8:e65226
48. Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*; 2003;2:29–34
49. Reuter K, Steinbach A, Helms V. Interfering with Bacterial Quorum Sensing. *Perspect Medicin Chem* 2016;8:1–15
50. Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, et al. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology*; 2001;147: 3249-62
51. Pompilio A, Crocetta V, De Nicola S, Verginelli F, Fiscarelli E, Di Bonaventura G. Cooperative pathogenicity in cystic fibrosis: *Stenotrophomonas maltophilia* modulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in mixed biofilm. *Front Microbiol*; 2015;6:951
52. Goss CH, Muhlebach MS. Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros. European Cystic Fibrosis Society.*; 2011;10:298–306
53. Ratjen F, Comes G, Paul K, Posselt HG, Wagner TO, Harms K. Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* . 2001; 31:13–6
54. Smyth AR, Walters S. Prophylactic anti-staphylococcal antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;11: CD001912
55. Ren CL, Morgan WJ, Konstan MW, Schechter MS, Wagener JS, Fisher KA, et al. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. *Pediatr Pulmonol*; 42:513–8
56. Dasenbrook EC, Konstan MW, Lechtzin N, Boyle MP. Association Between Respiratory Tract Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Survival in Cystic Fibrosis. *JAMA*. 2010;303:2386–92
57. Hubert D, Réglier-Poupet H, Sermet-Gaudelus I, Ferroni A, Le Bourgeois M, Burgel P-R, et al. Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*;12:497–503
58. Fuller J, Fisher AJ. An update on lung transplantation. *Breathe*; 2013;9:188–200
59. Lo DKH, Hurley MN, Muhlebach MS, Smyth AR. REVIEW: Interventions for the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in people with cystic fibrosis. *Cochrane database Syst Rev*. 2013;2:CD009650
60. Chmiel JF, Aksamit TR, Chotirmall SH, Dasenbrook EC, Elborn JS, LiPuma JJ, et al. Antibiotic Management of Lung Infections in Cystic Fibrosis. I. The Microbiome, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* , Gram-Negative Bacteria, and Multiple Infections. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11:1120–9

61. Fontanals D, Bou R, Pons I, Sanfeliu I, Domínguez a, Pineda V, et al. Prevalence of *Haemophilus influenzae* carriers in the Catalan preschool population. Working Group on Invasive Disease Caused by *Haemophilus influenzae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19:301–4
62. Starner TD, Zhang N, Kim G, Apicella MA, McCray PB. *Haemophilus influenzae* Forms Biofilms on Airway Epithelia. Am J Respir Crit Care Med. American Thoracic Society; 2006;174:213–20
63. Thornton CS, Brown EL, Alcantara J, Rabin HR, Parkins MD. Prevalence and impact of *Streptococcus pneumoniae* in adult cystic fibrosis patients: a retrospective chart review and capsular serotyping study. BMC Pulm Med. 2015;15:49
64. Campo R Del. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2005;43:2207–14
65. Pimentel de Araujo F, D'Ambrosio F, Camilli R, Fiscarelli E, Di Bonaventura G, Baldassarri L, et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* clones from paediatric patients with cystic fibrosis. J Med Microbiol . Microbiology Society; 2014;63:1704–15
66. Mahenthalingam E, Baldwin A, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. J Med Microbiol . Microbiology Society; 2002;51:533–8
67. Drevinek P, Mahenthalingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. Clin Microbiol Infect . ; 2010 1;16:821–30
68. Manno G, Dalmastri C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, et al. Epidemiology and Clinical Course of *Burkholderia cepacia* Complex Infections, Particularly Those Caused by Different *Burkholderia cenocepacia* Strains, among Patients Attending an Italian Cystic Fibrosis Center. J Clin Microbiol. 2004;42:1491–7
69. Janhsen WK, Arnold C, Hentschel J, Lehmann T, Pfister W, Baier M, Böer K, Hünninger K, Kurzai O, Hipler UC, Mainz JG. Colonization of CF patients' upperairways with *S. aureus* contributes more decisively to upper airway inflammation than *P. aeruginosa*. Med Microbiol Immunol. 2016;205:485-500
70. Perry JD, Laine L, Hughes S, Nicholson A, Galloway A, Gould FK. Recovery of antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from sputa of cystic fibrosis patients by culture on selective media. J Antimicrob Chemother. 2008;61:1057–61
71. Lipuma JJ. Update on the *Burkholderia cepacia* complex. Curr Opin Pulm Med.; 2005;11:528-33
72. Salsgiver EL, Fink AK, Knapp EA, LiPuma JJ, Olivier KN, Marshall BC, et al. Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients with Cystic Fibrosis. Chest; 2015;149:390–400
73. Amin R, Waters V. Antibiotic treatment for *Stenotrophomonas maltophilia* in people with cystic fibrosis. Cochrane database Syst Rev ; 2014;4:CD009249
74. Waters VJ, Stanojevic S, Sonneveld N, et al. Factors associated with response to treatment

- of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*; 2015;14: 755-62
75. Trancassini M, Iebba V, Citerà N, Tuccio V, Magni A, Varesi P, et al. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* in an Italian Cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains. *Front Microbiol*; 2014; 5:138
 76. De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S, Haerynck F, Vanechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J Cyst Fibros*; 2007;6:75–8
 77. Lambiase A, Catania MR, Del Pezzo M, Rossano F, Terlizzi V, Sepe A, et al. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:973–80
 78. Wang M, Ridderberg W, Hansen CR, Høiby N, Jensen-Fangel S, Olesen H V, et al. Early treatment with inhaled antibiotics postpones next occurrence of *Achromobacter* in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*; 2013;12:638–43
 79. Emerson J, McNamara S, Buccat AM, Worrell K, Burns JL. Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45:363–70
 80. Pierre-audigier C, Ferroni A, Bourgeois M Le, Offredo C, Vu-thien H, Fauroux B, et al. Age-Related Prevalence and Distribution of Nontuberculous Mycobacterial Species among Patients with Cystic Fibrosis Age-Related Prevalence and Distribution of Nontuberculous Mycobacterial Species among Patients with Cystic Fibrosis. 2005;43:3467–70
 81. Hjelte L, Petrini B, Källenius G, Strandvik B. Prospective study of mycobacterial infections in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 1990;45:397–400
 82. Whittaker L a., Teneback C. Atypical mycobacterial and fungal infections in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009;30:539–46
 83. Cole DE, Olivier KN. The challenge of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *South Med J*. 2005;98:964
 84. Girón RM, Máiz L, Barrio I, Teresa Martínez M, Salcedo A, Prados C. Estudio multicéntrico de prevalencia de micobacterias ambientales en pacientes con fibrosis quística. *Arch Bronconeumol*. 2008;44:679–84
 85. Jordan PW, Stanley T, Donnelly FM, Elborn JS, McClurg RB, Millar BC, et al. Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: Update on clinical microbiology methods. *Lett Appl Microbiol*. 2007;44:459–66
 86. Seddon P, Fidler K, Raman S, Wyatt H, Ruiz G, Elston C, et al. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis clinics, United Kingdom, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:1128–30
 87. Qvist T, Pressler T, Høiby N, Katzenstein TL. Shifting paradigms of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Respir Res*. 2014;15:41
 88. Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis*.
-

2014;6 :210–20

89. Girón RM, Domingo D, Buendía B, Antón E, Ruiz-Velasco LM, Ancochea J. Micobacterias ambientales en pacientes adultos con fibrosis quística. *Arch Bronconeumol*; 2005;41:560–5
90. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott B a., Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* . 2007;175:367–416
91. Waters V, Ratjen F. Antibiotic treatment for nontuberculous mycobacteria lung infection in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* . 2012;12:CD010004
92. 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* . ; 2010;9:110–6
93. Güngör O, Tamay Z, Güler N, Erturan Z. Frequency of fungi in respiratory samples from Turkish cystic fibrosis patients. *Mycoses* . 2013;56:123–9
94. Kanthan SK, Bush A, Kemp M, Buchdahl R. Factors effecting impact of *Aspergillus fumigatus* sensitization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* ; 2007;42:785–93
95. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The Effect of Chronic Infection With *Aspergillus fumigatus* on Lung Function and Hospitalization in Cystic Fibrosis Patients. *Chest* . 2009;171–6
96. 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;17:1381–6
97. Russell GK, Gadhok R, Simmonds NJ. The destructive combination of *Scediosporium apiosperum* lung disease and exuberant inflammation in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2013;14 Suppl 1:22-5
98. Calderón EJ, Friaiza V, Dapena FJ, de La Horra C. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2010;48 Suppl 1:S17–21
99. Montes-Cano M a., 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;13:1008–11
100. Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, Costa MC, Calderón EJ, Antunes F, et al. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:356–62
101. Hernández-Hernández F, Fréalle E, Caneiro P, Salleron J, Durand-Joly I, Accoceberry I, et al. Prospective multicenter study of *Pneumocystis jirovecii* colonization among cystic fibrosis patients in France. *J Clin Microbiol*. 2012;50:4107–10
102. Peterson JC, Cushion MT. *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Curr Opin Microbiol* . 2005;8:393–8
103. Garcia DF, Hiatt PW, Jewell A, Schoonover SL, Cron SG, Riggs M, et al. Human

- metapneumovirus and respiratory syncytial virus infections in older children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2007; 42:66-74
104. Wat D, Gelder C, Hibbitts S, Cafferty F, Bowler I, Pierrepont M, et al. The role of respiratory viruses in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* . 2008;7:320–8
105. Lysholm F, Wetterbom A, Lindau C, et al. Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomics sequencing. *PLoS One*. 2012;7:e30875
106. Olesen HV, Nielsen LP, Schiøtz PO. Viral and atypical bacterial infections in the outpatient pediatric cystic fibrosis clinic. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41:1197–204
107. Wat D, Doull I. Respiratory virus infections in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2003;4:172–7
108. Wark PAB, Tooze M, Cheese L, Whitehead B, Gibson PG, Wark KF, et al. Viral infections trigger exacerbations of cystic fibrosis in adults and children. *Eur Respir J*. 2012;40:510–2
109. Waters V, Ratjen F. Pulmonary Exacerbations in Children with Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12 Suppl 2:S200-6
110. Thumerelle C, Deschildre A, Bouquillon C, Santos C, Sardet A, Scalbert M, et al. Role of viruses and atypical bacteria in exacerbations of asthma in hospitalized children: a prospective study in the Nord-Pas de Calais region (France). *Pediatr Pulmonol* ; 2003;35:75–82
111. Metaxas EI, Balis E, Papaparaskevas J, Spanakis NE, Tatsis G, Tsakris A. Bronchiectasis exacerbations: The role of atypical bacteria and respiratory syncytial virus. *Can Respir J*. 2015;22:163–6
112. Cantón R, Olmos AF, Gómez E, Pedrosa G De, Campo R, Meseguer A. Infección bronquial crónica: el problema de *Pseudomonas aeruginosa*. 2015;47(Supl6):8–13
113. Rogers GB, Stressmann FA, Walker AW, Carroll MP, Bruce KD. Lung infections in cystic fibrosis: deriving clinical insight from microbial complexity. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010; 10: 187-96
114. Rabin HR, Surette MG. The cystic fibrosis airway microbiome. *Curr Opin Pulm Med*. 2012;18:622-7
115. Requero EC. Diagnóstico y seguimiento microbiológico de la colonización respiratoria por *Pseudomonas aeruginosa* en fibrosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27:89-104
116. Lim YW, Evangelista JS, Schmieder R, Bailey B, Haynes M, Furlan M, et al. Clinical Insights from Metagenomic Analysis of Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* . 2013;52:425–37
117. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3:31
118. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-liggett C, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*. 2007;449:804–10

119. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May G a., William Costerton J, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: Impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:193–213
120. Consortium Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486:207-14
121. Rappé MS, Giovannoni SJ. The Uncultured Microbial Majority. *Annu Rev Microbiol .* 2003;57:369–94
122. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev .* 2004;68:669–85
123. Wilson K, Blichington R. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Envir Microbiol .* 1996;62:2273–8
124. Rodicio R, Mendoza C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:238-45
125. Cox MJ, Cookson WO, Moffatt MF. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum Mol Genet .* 2013;22:88–94
126. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clin Chem .* 2009;55:856–66
127. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol .* Public Library of Science. 2012;8:e1002808
128. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res .* 2009;37:D141–5
129. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J . Nature Publishing Group;* 2012;6:610–8
130. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D590–6
131. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7:335-6
132. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol .* 2009;75:7537–41
133. Frank DN, Zhu W, Sartor RB, Li E. Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses. *Trends Microbiol.* 2011;19:427–34
134. Sekirov I, Finlay BB. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J Physiol .* 2009;587:4159–67

135. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* . 2008;14:908–34
136. Zengler K. Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA* . 2002;99:15681–6
137. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* . ; 2008 24:133–41
138. Mardis ER. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annu Rev Anal Chem* . 2013;6:287–303
139. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, et al. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2014;11:333-43
140. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* . Nature Publishing Group; 2010;11:31–46
141. Zemanick ET, Wagner BD, Sagel SD, Stevens MJ, Accurso FJ, Kirk Harris J. Reliability of quantitative real-time PCR for bacterial detection in cystic fibrosis airway specimens. *PLoS One*. 2010 30;5:e15101
142. Surette MG. The cystic fibrosis lung microbiome. *Annals of the American Thoracic Society*. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11 Suppl 1:61-5
143. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol* . 2015:1–24
144. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* . American Thoracic Society; 2011;184:957–63
145. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio* . 2015;6:e00037
146. Erb-Downward JR, Huffnagle GB, Martinez FJ. The microbiota in respiratory disease. *Am J Respir Crit Care Med* . American Thoracic Society; 2012;185:1037–8
147. Tracy M, Cogen J, Hoffman LR. The pediatric microbiome and the lung. *Curr Opin Pediatr* . 2015;27:348–55
148. Hampton TH, Green DM, Cutting GR, Morrison HG, Sogin ML, Gifford AH, et al. The microbiome in pediatric cystic fibrosis patients: the role of shared environment suggests a window of intervention. *Microbiome*. 2014;2:14
149. Bogaert D, Keijser B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, van Gils E, et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: A metagenomic analysis. *PLoS One*. 2011; 6: e17035
150. Brogden KA, Guthmiller JM, Taylor CE. Human polymicrobial infections. *Lancet* 2005; 365:253–5
151. Siqueira JF, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to

- the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* . 2009;107:870–8
152. Galiana A, Aguirre E, Rodriguez JC, Mira A, Santibañez M, Candela I, et al. Sputum microbiota in moderate versus severe patients with COPD. *Eur Respir J* . 2014;43:1787–90
153. Renwick J, McNally P, John B, DeSantis T, Linnane B, Murphy P. The Microbial Community of the Cystic Fibrosis Airway Is Disrupted in Early Life. *PLoS One* . 2014;9:e109798
154. Miller MB, Gilligan PH. Laboratory Aspects of Management of Chronic Pulmonary Infections in Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* . 2003;41:4009–15
155. Bittar F, Richet H, Dubus JC, 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:e2908
156. Magalhães AP, Azevedo NF, Pereira MO, Lopes SP. The cystic fibrosis microbiome in an ecological perspective and its impact in antibiotic therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100:1163-81
157. Coburn B, Wang PW, Diaz Caballero J, Clark ST, Brahma V, Donaldson S, et al. Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci Rep* . Nature Publishing Group; 2015;5:10241
158. 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. *PLoS One* . 2012;7:e36313.159.
159. Blainey PC, Milla CE, Cornfield DN, Quake SR. Quantitative analysis of the human airway microbial ecology reveals a pervasive signature for cystic fibrosis. *Sci Transl Med*. 2012;4:153
160. Stressmann FA, Rogers GB, Klem ER, Lilley AK, Donaldson SH, Daniels TW, et al. Analysis of the bacterial communities present in lungs of patients with cystic fibrosis from American and British centers. *J Clin Microbiol* . 2011;49:281–91
161. Van der Gast CJ, Walker AW, Stressmann FA, Rogers GB, Scott P, Daniels TW, et al. Partitioning core and satellite taxa from within cystic fibrosis lung bacterial communities. *ISME J*. 2011;5:780-91
162. Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, et al. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177:995-1001
163. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* . American Society for Clinical Investigation; 2002;109:317–25
164. Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax*. 2007;62:360–7
165. LiPuma J. The new microbiology of cystic fibrosis: it takes a community. *Thorax* . 2012;67:851–2

166. Boutin S, Graeber SY, Weitnauer M, Panitz J, Stahl M, Clausnitzer D, et al. Comparison of Microbiomes from Different Niches of Upper and Lower Airways in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis. *PLoS One* . 2015;10:e0116029
167. Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, Baek MS, Huang YJ, Daly R a., et al. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2010;5:e11044
168. Stressmann FA, Rogers GB, Gast van der, Christopher J, Marsh P, Vermeer LS, et al. Long-term cultivation-independent microbial diversity analysis demonstrates that bacterial communities infecting the adult cystic fibrosis lung show stability and resilience. *Thorax*. 2012;67:867-73
169. Carmody L a., Zhao J, Schloss PD, Petrosino JF, Murray S, Young VB, et al. Changes in cystic fibrosis airway microbiota at pulmonary exacerbation. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10:179–87
170. Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Duan K, Norgaard JC, Surette MG. A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15070-5
171. Rogers GB, Marsh P, Stressmann a. F, Allen CE, Daniels TVW, Carroll MP, et al. The exclusion of dead bacterial cells is essential for accurate molecular analysis of clinical samples. *Clin Microbiol Infect* . European Society of Clinical Infectious Diseases; 2010;16:1656–8
172. Zemanick ET, Wagner BD, Robertson CE, Stevens MJ, Szeffler SJ, Accurso FJ, et al. Assessment of Airway Microbiota and Inflammation in Cystic Fibrosis Using Multiple Sampling Methods. *Ann Am Thorac Soc* . 2015;12:221–9
173. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. *Lancet Respir Med*. 2014;2:238–46
174. Zhao J, Schloss PD, Kalikin LM, Carmody L a., Foster BK, Petrosino JF, et al. Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:5809–14
175. Roman F, Canton R, Perez-Vazquez M, Baquero F, Campos J. Dynamics of Long-Term Colonization of Respiratory Tract by *Haemophilus influenzae* in Cystic Fibrosis Patients Shows a Marked Increase in Hypermutable Strains. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1450-9
176. Klepac-Ceraj V, Lemon KP, Martin TR, Allgaier M, Kembel SW, Knapp A a., et al. Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*. 2010;12:1293–303
177. Sherrard LJ, McGrath SJ, McIlreavey L, Hatch J, Wolfgang MC, Muhlebach MS, et al. Production of extended-spectrum β -lactamases and the potential indirect pathogenic role of *Prevotella* isolates from the cystic fibrosis respiratory microbiota. *Int J Antimicrob Agents* . ; 2015;47:140–5

178. Murphy TF, Bakaletz LO, Smeesters PR. Microbial interactions in the respiratory tract. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:S121-6
179. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006;130:1441-7
180. Kerem E, Corey M, Kerem B et al. The Relation between Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis — Analysis of the Most Common Mutation ($\Delta F508$). *N Engl Med*. 1990;323:1517-22
181. Song Y, Salinas D, Nielson DW, Verkman AS. Hyperacidity of secreted fluid from submucosal glands in early cystic fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* . 2006;290:C741-9
182. De Gracia J, Mata F, Alvarez a, Casals T, Gatner S, Vendrell M, et al. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2005;60:558-63
183. Green DM, Collaco JM, McDougal KE, Naughton KM, Blackman SM, Cutting GR. Heritability of respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Pediatr* . ; 2012;161:290-5.e1
184. Collaco JM, Blackman SM, McGready J, Naughton KM, Cutting GR. Quantification of the relative contribution of environmental and genetic factors to variation in cystic fibrosis lung function. *J Pediatr* . ; 2010;157:802-7
185. Harris JK, De Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, et al. Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:20529-33
186. Fodor A a., Klem ER, Gilpin DF, Elborn JS, Boucher RC, Tunney MM, et al. The Adult Cystic Fibrosis Airway Microbiota Is Stable over Time and Infection Type, and Highly Resilient to Antibiotic Treatment of Exacerbations. *PLoS One*. 2012;7:e45001
187. Twomey KB, Alston M, An S-Q, O'Connell OJ, McCarthy Y, Swarbreck D, et al. Microbiota and metabolite profiling reveal specific alterations in bacterial community structure and environment in the cystic fibrosis airway during exacerbation. *PLoS One* . Public Library of Science; 2013;8:e82432
188. Whelan FJ, Surette MG. Clinical Insights into Pulmonary Exacerbations in Cystic Fibrosis from the Microbiome. What Are We Missing? *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12 Suppl 2:S207-11
189. Jones AM. Anaerobic bacteria in cystic fibrosis: pathogens or harmless commensals? *Thorax* . 2011;66:558-9
190. Daniels TW V, Rogers GB, Stressmann FA, van der Gast CJ, Bruce KD, Jones GR, et al. Impact of antibiotic treatment for pulmonary exacerbations on bacterial diversity in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2013;12:22-8
191. Collie D, Glendinning L, Govan J, Wright S, Thornton E, Tennant P, et al. Lung Microbiota Changes Associated with Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection and the Impact of Intravenous Colistimethate Sodium. *PLoS One*; 2015;10:e0142097
192. Tunney MM, Klem ER, Fodor AA, Gilpin DF, Moriarty TF, McGrath SJ, et al. Use of culture

- and molecular analysis to determine the effect of antibiotic treatment on microbial community diversity and abundance during exacerbation in patients with cystic fibrosis. *Thorax* . 2011;66:579–84
193. Smith DJ, Badrick AC, Zakrzewski M, Krause L, Bell SC, Anderson GJ, et al. Pyrosequencing reveals transient cystic fibrosis lung microbiome changes with intravenous antibiotics. *Eur Respir J* . 2014;44:922–30
194. Flanagan JL, Brodie EL, Weng L, Lynch S V., Garcia O, Brown R, et al. Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1954–62
195. Rogers GB, Stressmann FA, Koller G, Daniels T, Carroll MP, Bruce KD. Assessing the diagnostic importance of nonviable bacterial cells in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* .; 2008;62:133–41
196. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, et al. HHS Public Access. 2016;373:220–31
197. Sibley CD, Grinwis ME, Field TR, Eshaghurshan CS, Faria MM, Dowd SE, et al. Culture enriched molecular profiling of the cystic fibrosis airway microbiome. *PLoS One*. 2011;6:e22702
198. Muldrew KL. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr*.2009;21:102-11
199. Willner D, Furlan M, Haynes M et al. Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PLoS One*. 2009;4:e7370
200. Hoen AG, Li J, Moulton LA, O'Toole GA, Housman ML, Koestler DC, et al. Associations between Gut Microbial Colonization in Early Life and Respiratory Outcomes in Cystic Fibrosis. *J Pediatr* . ; 2015;167:138–47
201. Segal LN, Blaser MJ. Harnessing the Early-Life Microbiota to Protect Children with Cystic Fibrosis. *J Pediatr* . ; 2015;167:16–8.e1
202. Willner D, Haynes MR, Furlan M, Schmieder R, Lim YW, Rainey PB, et al. Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung. *ISME J* . Nature Publishing Group; 2012;6:471–4
203. Yang L, Jelsbak L, Molin S. Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways. *Environ Microbiol*. 2011;13:1682–9
204. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* . ; 2008 ;153:S4–14
205. Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H, Barreto C, Bilton D, et al. Standards of care for patients with cystic fibrosis: A European consensus. *J Cyst Fibros*. 2005;4:7–26
206. Costa CM, Giner CP. 5 Valoración del estado nutricional. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHPN-AEP*. 2012;1:314–8

207. Whittaker R. Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon*. 1972;21:213–51
208. Gotelli NJ, Chao A. Measuring and estimating species richness, species diversity and biotic similarity from sampling data . *Encyclopedia of Biodiversity*. Nueva York: Ed. Elsevier; 2013. Segunda Edición
209. Moreno CE. Métodos para medir la biodiversidad. *M&T - Manuales y Tesis SEA*. 2001;1:84
210. Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi a F, Bray-Ward P, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2002;99:5261–6
211. Lovmar L, Syvänen A-C. Multiple displacement amplification to create a long-lasting source of DNA for genetic studies. *Hum Mutat* . Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2006;27:603–14
212. Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes. *Biosens Bioelectron* ; 2014;64:196–211
213. Liang J, Cai W, Sun Z. Single-Cell Sequencing Technologies: Current and Future. *J Genet Genomics*. 2014;41:513–28
214. Rowntree RK, Harris A. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Ann Hum Genet*. Blackwell Science Ltd; 2003;67:471–85
215. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008;7:179–96
216. Masekela R, Zampoli M, Westwood AT, White DA, Green RJ. Phenotypic expression of the 3120 + 1G N A mutation in non-Caucasian children with cystic fibrosis in South Africa. 2013;12:363–6
217. Kiliç MO, Niniş VN, Tolun A, et al. Genotype-phenotype correlation in three homozygotes for the cystic fibrosis mutation 2183AA-->G shows a severe phenotype. *J Med Genet*. 2000;37:307-9
218. Moya-Quiles MR, Glover G, Mondéjar-López P, Pastor-Vivero MD, Fernández-Sánchez A, Sánchez-Solís M. CFTR H609R mutation in Ecuadorian patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009; 8:280–1
219. Gollwitzer ES, Marsland BJ. Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases - Potential for therapy. *Pharmacol Ther*. 2014;141:32-9
220. Zemanick ET, Hoffman LR. Cystic Fibrosis: Microbiology and Host Response. *Pediatr Clin North Am*. 2016;63:617–36
221. de Dios Caballero J, Del Campo R, Royuela A, Solé A, Máiz L, Oliveira C, et al. Bronchopulmonary infection-colonization patterns in Spanish cystic fibrosis patients: Results from a national multicenter study. *J Cyst Fibros*. 2016;15:357–65
222. Whiteson KL, Bailey B, Bergkessel M, Conrad D, Delhaes L, Felts B, et al. The upper respiratory tract as a microbial source for pulmonary infections in cystic fibrosis. Parallels from island biogeography. *Am J Respir Crit Care Med* . American Thoracic Society;

- 2014;189:1309–15
223. Rogers GB, Shaw D, Marsh RL, Carroll MP, Serisier DJ, Bruce KD. Respiratory microbiota: addressing clinical questions, informing clinical practice. *Thorax* . 2015;70:74–81
224. Loberto JCS, De Paiva Martins CA, Ferreira Dos Santos SS, Cortelli JR, Cardoso Jorge AO. *Staphylococcus* spp. in the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. *Brazilian J Microbiol.* 2004;35:64–8
225. Caverly LJ, Zhao J, LiPuma JJ. Cystic fibrosis lung microbiome: Opportunities to reconsider management of airway infection. *Pediatr Pulmonol.* 2015;50:S31-8
226. Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Ann Am Thorac Soc* . American Thoracic Society; 2014;11:108–16
227. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, et al. Nontuberculous mycobacteria: I: Multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:828–34
228. Kramná L, Vilimovská K, De D, Pavel D. Antibiotic therapy alters lung microbiome in pediatric cystic fibrosis patients. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Congress.* 2016;400213
229. VanDevanter DR, LiPuma JJ. Microbial diversity in the cystic fibrosis airways: where is the sting? *Future Microbiol.* 2012;7:801–3
230. Stressmann FA, Rogers GB, Marsh P, Lilley AK, Daniels TW V, Carroll MP, et al. Does bacterial density in cystic fibrosis sputum increase prior to pulmonary exacerbation? *J Cyst Fibros.* ; 2011;10:357–65
231. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Homeostasis and its disruption in the lung microbiome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309:L1047–55
232. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol* . Nature Publishing Group; 2014;14:827–35
233. Zhao J, Murray S, Lipuma JJ. Modeling the impact of antibiotic exposure on human microbiota. *Sci Rep* . 2014;4:4345
234. Southern KW, Barker PM, Solis-Moya A, Patel L. Macrolide antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane database Syst Rev* .2012;11:CD002203
235. Tateda K, Standiford TJ, Pechere JC, Yamaguchi K. Regulatory effects of macrolides on bacterial virulence: potential role as quorum-sensing inhibitors. *Curr Pharm Des.* 2004;10:3055–65
236. Davies JC. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev.* 2002,3:128-34
237. Brown PS, Pope CE, Marsh RL, Qin X, Mcnamara S, Gibson R, et al. Directly Sampling the Lung of a Young Child with Cystic Fibrosis Reveals Diverse Microbiota. *Ann Am Thorac Soc.* 2014; 11:1049–55

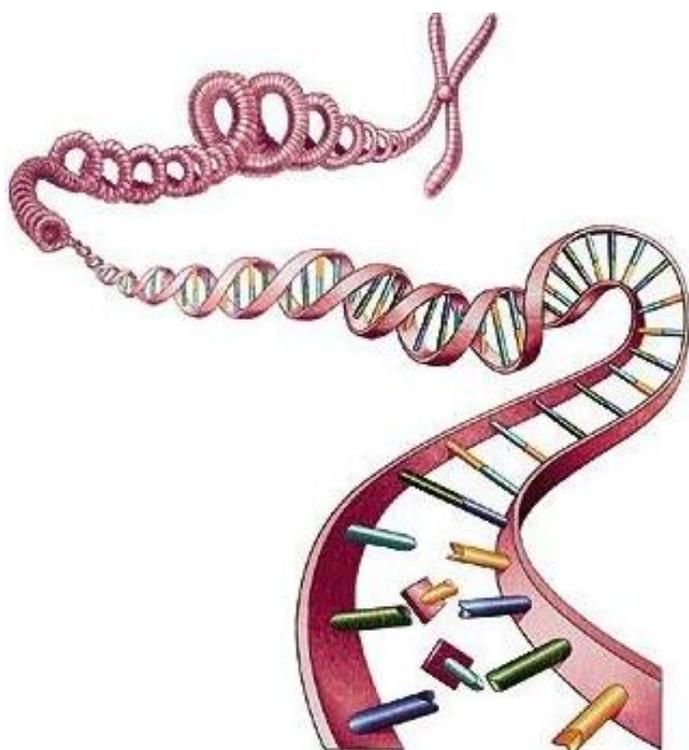
238. Parkins MD, Surette MG. Understanding the natural history and clinical implications of airways infections in CF - Moving beyond the classics. *J Cyst Fibros* . 2016; ;15:270–1
239. Manor O, Levy R, Pope CE, Hayden HS, Brittnacher MJ, Carr R, et al. Metagenomic evidence for taxonomic dysbiosis and functional imbalance in the gastrointestinal tracts of children with cystic fibrosis. *Sci Rep* . Nature Publishing Group; 2016;6:22493
240. Evans AS. Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *Yale J Biol Med*. 1976;49:175–95
241. Carmody L a, Zhao J, Kalikin LM, Lebar W, Simon RH, Venkataraman A, et al. The daily dynamics of cystic fibrosis airway microbiota during clinical stability and at exacerbation. 2015;1–11
242. Zemanick ET, Harris JK, Wagner BD, Robertson CE, Sagel SD, Stevens MJ, et al. Inflammation and Airway Microbiota during Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbations. *PLoS One*. 2013;8:e62917
243. Ratjen F. Diagnosing and managing infection in CF. *Paediatr Respir Rev*. 2006. 7 Suppl 1:S151-3
244. Adler FR, Liou TG. The dynamics of disease progression in cystic fibrosis. *PLoS One*. 2016;11: 1–17
245. Bacci G, Paganin P, Lopez L, Vanni C, Dalmastrì C, Cantale C, et al. Pyrosequencing unveils cystic fibrosis lung microbiome differences associated with a severe lung function decline. *PLoS One*. 2016;11;1–16
246. Flume PA, O’Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med* . American Thoracic Society; 2007;176:957–69
247. O’Neill K, Bradley JM, Johnston E, McGrath S, McIlreavey L, Rowan S, et al. Reduced bacterial colony count of anaerobic bacteria is associated with a worsening in lung clearance index and inflammation in cystic fibrosis. *PLoS One* . 2015;10:e0126980
248. Quinn RA, Whiteson K, Lim Y-W, Salamon P, Bailey B, Mienardi S, et al. A Winogradsky-based culture system shows an association between microbial fermentation and cystic fibrosis exacerbation. *ISME J* . Nature Publishing Group; 2015;9:1024–38
249. Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol*. 2003;50:1477–91
250. Lambiase A, Catania MR, Rossano F. Anaerobic bacteria infection in cystic fibrosis airway disease. *New Microbiol* . 2010;33:185–94
251. Mahenthiralingam E. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. *Paediatr Respir Rev* . Ltd; 2014;15:13–5
252. Lemon KP, Armitage GC, Relman D a., Fischbach M a. Microbiota-Targeted Therapies: An Ecological Perspective. *Sci Transl Med*. 2012;4:137
253. Conrad D, Haynes M, Salamon P, Rainey PB, Youle M, Rohwer F. Cystic fibrosis therapy: A

- community ecology perspective. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013, 48:150-6
254. MacGowan AP, Wise R. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of in vitro susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother* . 2001;48(suppl 1):17-28
255. Foweraker JE, Laughton CR, Brown DFJ, Bilton D. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* . 2005;55:921-7
256. Hurley MN, Ariff AHA, Bertenshaw C, Bhatt J, Smyth AR. Results of antibiotic susceptibility testing do not influence clinical outcome in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2012;11:288-92
257. Moskowitz SM, Emerson JC, McNamara S, Shell RD, Orenstein DM, Rosenbluth D, et al. Randomized trial of biofilm testing to select antibiotics for cystic fibrosis airway infection. *Pediatr Pulmonol.*; 2011;46:184-92
258. Bode LGM, van Wunnik P, Vaessen N, Savelkoul PHM, Smeets LC. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in screening samples by relative quantification between the *mecA* gene and the SA442 gene. *J Microbiol Methods*. 2012;89:129-32
259. Marozkina N V, Gaston B. Nitrogen balance in the ecosystem of the cystic fibrosis lung. *Am J Respir Crit Care Med* . 2011 May 15;183:1290-2
260. Short FL, Murdoch SL, Ryan RP. Polybacterial human disease: the ills of social networking. *Trends Microbiol* . ; 2014;22:508-16
261. Rainey PB, Buckling A, Kassen R, Travisano M. The emergence and maintenance of diversity: insights from experimental bacterial populations. *Trends Ecol Evol*. 2000;15:243-7
262. Lopes SP, Ceri H, Azevedo NF, Pereira MO. Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *Int J Antimicrob Agents* . ; 2012;40:260-3
263. Little AE, Robinson CJ, Peterson SB, Raffa KF, Handelsman J. Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annu Rev Microbiol* . 2008;62:375-401
264. Carmody LA, Gill JJ, Summer EJ, Sajjan US, Gonzalez CF, Young RF, et al. Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J Infect Dis* . 2010;201:264-71
265. McNulty NP, Yatsunenkov T, Hsiao A, Faith JJ, Muegge BD, Goodman AL, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med* . 2011 3:106ra106
266. Sherrard LJ, Tunney MM, Elborn JS. Infections in chronic lung diseases 2 Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *Lancet* . 2014;384:703-13
267. Hunter RC, Asfour F, Dingemans J, Osuna BL, Samad T, Malfroot A, et al. Ferrous iron is a

- significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways. *MBio* . 2013;4:e00557–13
268. Hauser PM, Bernard T, Greub G, Jaton K, Pagni M, Hafen GM. Microbiota Present in Cystic Fibrosis Lungs as Revealed by Whole Genome Sequencing. 2014;9:1–7
269. Zhao J, Carmody LA, Kalikin LM, Li J, Petrosino JF, Schloss PD, et al. Impact of enhanced *Staphylococcus* DNA extraction on microbial community measures in cystic fibrosis sputum. *PLoS One*. Public Library of Science; 2012;7:e33127







ANEXOS



ANEXO I: APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE



Hospital Universitario
12 de Octubre
Comunidad de Madrid



Nº CEIC: 14/215

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACION CLINICA

Dña. MARIA UGALDE DIEZ, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Doce de Octubre.

CERTIFICA:

Que este Comité, en la reunión celebrada el día 30/03/2015, ha evaluado los aspectos éticos del Proyecto de Investigación titulado:

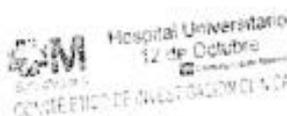
ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DE VIAS RESPIRATORIAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON FIBROSIS QUISTICA MEDIANTE SECUENCIACION MASIVA Y SU RELACION CON DISTINTAS VARIABLES CLINICAS

Del cual el/la Dr. /Dra. **GARCIA HERNANDEZ, Gloria**
Del Servicio de **ALERGIA PEDIÁTRICA** es el Investigador Principal

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este Centro, cumpliendo los requisitos metodológicos necesarios, este Comité **INFORMA FAVORABLEMENTE** a la realización de dicho proyecto en este Centro.

Lo que firmo en Madrid, a 4 de abril de 2015

Firmado: **Dra. Maria Ugalde Diez**
Secretaria CEIC Hospital 12 de Octubre.





ANEXO II: FORMULARIO DE ENCUESTA

1. N° de orden

2. N° Historia

3. Nombre y Apellidos

4. Edad: años meses

5. Sexo Hombre Mujer

6. Espujo inducido Aspirado nasofaríngeo LBA

7. Resultado microbiológico

INTRÍNECAS - ENF DATOS GENERALES

8. N° Hermanos 9. Orden de fríata

10. N° Hermanos con FQ 11. Edad al Dx: años meses

12. Genotipo

13. Screening neonatal (+) (-) No 14. Cloruro en sudor (máx)

15. Evolución previo al Dx: años meses 16. Schwachman-K

17. Síntomas principales al Dx: 1. Resp. 2. Digest. 3. Metab 4. Otras

ACTUALMENTE

18. E. Nutricional - Ratio IMC (sobre el p50 de su edad)

ACTUALMENTE

	Si	No
19. Diabetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20. Insuficiencia pancreática (Recibe enzimas pancr. o Van de Kamer (+))	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
21. Afectación hepática	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
22. Afectación de senos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23. Alteraciones electrolíticas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24. Afectación otros órganos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ENFERMEDAD PULMONAR

25. FEV₁ %

26. Número de exacerbaciones

27. Último FENO

28. Necesidad de O₂: NO Intermitente Continuo

29. Necesidad de soporte ventilatorio NO Intermitente Continuo

30. LBA: NO SI Edad Resultados microbiológ

ENFERMEDAD PULMONAR

	Si	No
31. Exacerbaciones últimos 6 meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
32. Lesiones últimas Rx/TAC: infiltrados	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
33. " atelectasias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
34. " bronqueectasias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
35. " abscesos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
36. " enfisema	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
37. Comorbilidad alergia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
38. " asma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
39. " dermatitis atópica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
40. Antecedente Neumotorax/Hemoptisis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

MICROBIOLOGÍA

Germen	Portador actual	Muestra				Portador crónico	Intento Erradicación	Edad aparición	Edad desaparición	ATB/ Antifúngico	Duración tto (días)
		Esputo	Aspir. nasofar.	LBA	Otra						
42. <i>Haemophilus</i>	a) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	b) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	c) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	d) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	e) <input type="text"/>	f) <input type="text"/>	g) <input type="text"/>	h) <input type="text"/>
43. <i>S. aureus</i>	a) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	b) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	c) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	d) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	e) <input type="text"/>	f) <input type="text"/>	g) <input type="text"/>	h) <input type="text"/>
44. <i>P. aeruginosa</i>	a) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	b) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	c) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	d) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	e) <input type="text"/>	f) <input type="text"/>	g) <input type="text"/>	h) <input type="text"/>
45. <i>B. cepacia</i>	a) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	b) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	c) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	d) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	e) <input type="text"/>	f) <input type="text"/>	g) <input type="text"/>	h) <input type="text"/>
46. <i>S. maltophilia</i>	a) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	b) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	c) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	d) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	e) <input type="text"/>	f) <input type="text"/>	g) <input type="text"/>	h) <input type="text"/>
47. <i>A. xyloxydans</i>	a) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	b) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	c) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	d) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	e) <input type="text"/>	f) <input type="text"/>	g) <input type="text"/>	h) <input type="text"/>
48. Otras bacterias	a) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	b) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	c) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	d) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	e) <input type="text"/>	f) <input type="text"/>	g) <input type="text"/>	h) <input type="text"/>
49. Hongos	a) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	b) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	c) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	d) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	e) <input type="text"/>	f) <input type="text"/>	g) <input type="text"/>	h) <input type="text"/>

MICROBIOLOGÍA

	Portador actual micobacterias ambientales	Historia previa micobacterias ambientales	Especie	Intento Erradicación	Edad aparición	Edad desaparición	ATB/ Antifúngico	Duración tto (días)
50. Micobacterias	a) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	b) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	c) <input type="text"/>	d) Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	e) <input type="text"/>	f) <input type="text"/>	g) <input type="text"/>	h) <input type="text"/>

51. PPD: a) POS b) NEG c) NO realizado

52. IGRA/Cuantiferón

MICROBIOLOGÍA

53. Aislamiento otro germen en los últimos 6 meses

a) Identificación

b) Muestra

TRATAMIENTO

54. ATB sistém a) Si No b) cuál c) v.o i.v d) días

55. Tobí a) Si No b) en el momento de toma muestra Si No

56. Corticoides orales último mes a) Si No

57. Corticoides inhalados último mes a) Si No

58. Macrólidos orales intermitentes a) Si No

59. Suero salino hipertónico a) Si No

60. DNAse a) Si No

61. Salbutamol a) Si No

62. Inhibidor bomba protones a) Si No



ANEXO III : LISTADO DE RECOGIDA DE MUESTRAS

Secuenciación masiva en FQ

NE Orden	NHC	Fecha Recogida	Consentimiento		Encuesta		Muestra Congelada y		códigos
			SI	NO	SI	NO	SI	NO	
1									01/__/__
2									01/__/__
3									01/__/__
4									01/__/__
5									01/__/__
6									01/__/__
7									01/__/__
8									01/__/__
9									01/__/__
10									01/__/__
11									01/__/__
12									01/__/__
13									01/__/__
14									01/__/__
15									01/__/__
16									01/__/__
17									01/__/__
18									01/__/__
19									01/__/__
20									01/__/__
21									01/__/__
22									01/__/__
23									01/__/__
24									01/__/__
25									01/__/__
26									01/__/__
27									01/__/__
28									01/__/__
29									01/__/__
30									01/__/__



ANEXO IV: CONSENTIMIENTO INFORMADO



Hospital Universitario
12 de Octubre



ANEXO-II. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Hoja de **INFORMACION AL PACIENTE** para dar su consentimiento para participar en el estudio observacional:

Título del estudio:

Estudio de la microbiota de vías respiratorias en pacientes pediátricos con fibrosis quística mediante secuenciación masiva y su relación con distintas variables clínicas

Investigadores y dirección de contacto:

M^a Gloria García Hernández. Unidad de Fibrosis Quística. Hospital Universitario Doce de Octubre. Avenida de Córdoba s/n. 28041 Madrid. Telf.: 913908423

Juan Carlos Rodríguez Díaz. Sección de Microbiología y Parasitología. Hospital General Universitario de Alicante. c/Pintor Baeza nº 10, 03010 Alicante. Telf: 965 - 913935

Investigador principal y dirección de contacto:

El Dr. _____, médico que le atiende, y otros facultativos del Servicio de Microbiología en el Hospital Universitario de Alicante quieren estudiar los microorganismos presentes en las muestras de esputo de los pacientes con fibrosis quística y poner a punto nuevas técnica de diagnóstico microbiológico que permita predecir los patrones de colonización y la detección más rápida para favorecer la erradicación.

Para el estudio necesitaremos la recogida de datos de su historia clínica y muestras de esputo. El resto de las pruebas que se realicen serán las habituales. Al participar en este estudio no estará sometido a ningún perjuicio adicional o la toma de muestras invasivas.

La información obtenida tras este estudio podría no tener un beneficio directo en usted pero puede beneficiar a muchas personas que se encuentren en su misma situación y puede ayudar, si así lo indican las conclusiones del estudio, a cambiar el seguimiento microbiológico y los tratamientos con antibióticos.

Su participación en este proyecto de investigación es estrictamente voluntaria. Puede decidir no participar en este estudio o abandonarlo en cualquier momento sin tener que dar razones por ello. Esta decisión no influirá en la disponibilidad ni en la calidad de la atención sanitaria actual o futura que se le preste en este centro sanitario.

Sólo aquellos datos de su historia clínica que estén relacionados con el estudio serán objeto de comprobación. Esta comprobación será realizada por el Investigador Principal/ Investigadores Colaboradores, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los sujetos participantes en el ensayo clínico. Los datos recogidos para el estudio serán identificados mediante un código y sólo el Investigador Principal/ Investigadores Colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y su historia clínica.

Su confidencialidad de sus datos será protegida de acuerdo con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal y si además se transmiten datos a terceros se hará según lo establecido en la mencionada Normativa y el R.D. 994/99. Se le informa de que tiene derecho de acceso, rectificación y cancelación de sus datos en cualquier momento. Los resultados de este estudio de investigación pueden presentarse en congresos o publicarse; sin embargo, no se incluirá su identidad en esas presentaciones.

Hoja de CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO

Título del estudio: *Estudio de la microbiota de vías respiratorias en pacientes pediátricos con fibrosis quística mediante secuenciación masiva y su relación con distintas variables clínicas*

El firmar este documento no le compromete a nada. Puede retirar la autorización cuando desee. El retirar la autorización, siempre que lo desee, no supondrá en ningún caso ningún perjuicio para usted. Puede hacerlo cuando quiera y sin tener que dar explicaciones. Únicamente es necesario comunicarlo por escrito para añadir esa información a su historia clínica.

Yo

- He leído la hoja de información
- He podido preguntar mis dudas y he recibido suficiente información
- Se me ha explicado que mi autorización es voluntaria y que puedo retirarla cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin perder ningún derecho.

Doy mi conformidad para que se puedan realizar estudios sobre los datos de mi historia clínica y sobre las de heces aportadas.

FIRMA..... Fecha.....

ANEXO V: BIOBANCO



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIÓN OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS AL BIOBANCO DEL

HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE

1.- IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido se podrán tomar muestras de sus tejidos, sangre, así como fluidos (orina, esputo, saliva, etc) o microorganismos. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente cualquier muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a la que va a ser sometido a un biobanco de muestras biológicas, sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. Dichas muestras biológicas excedentes podrán ser utilizados en proyectos de investigación biomédica que previamente sean aprobados por los comités externos, ético y científico, a los que está adscrito el biobanco.

Las muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

2.- OBJETIVO

La finalidad del biobanco es recoger y almacenar muestras biológicas humanas para realizar proyectos de investigación biomédica o diagnósticos. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades y de nuevas medicinas para tratarlas.

3.- CONDICIONES DE LA DONACIÓN

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, podrán ayudar en el futuro a pacientes que tienen su misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras que usted dona no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales, pero los costes de obtención, conservación y envío de las muestras se repercutirán, sin ánimo de lucro, a quienes las utilicen.

La donación de muestras no impedirá que Usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando así lo requieran. Debe saber que será prioritario el uso diagnóstico de la muestra que dona y que se garantizará un remanente de las muestras para este fin.

En caso de producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto de las muestras.

4.- CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN

Se podría dar la circunstancia de ser contactado/a con el fin de recabar nueva información sobre su situación o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o rechazar dicha participación. Por tal motivo, es importante que comunique al Servicio de Admisión del centro FUTUROS CAMBIOS DE DIRECCIÓN y números de TELÉFONO, ya que es la única vía para poder contactar con usted.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud derivada del desarrollo de los proyectos de investigación y, en particular, datos genéticos con relevancia clínica. En este sentido, puede solicitar la información relativa a su salud derivada del estudio de las muestras donadas. Para ejercer este derecho,



tiene a su disposición en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud. La información que se obtenga puede ser relevante también para sus familiares biológicos. Es decisión suya informarnos – algo que nosotros le aconsejamos – con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cual es el riesgo personal y sus opciones de salud en un futuro.

Quando esta información, según criterio médico, sea necesaria para evitar un grave perjuicio a la salud de sus familiares biológicos, previa consulta del comité asistencial, se les informará de ello.

5.- DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, podrá decidir que sean destruidas o anonimizadas. Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

6.- RIESGOS

El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestra sobrante de la intervención.

La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en las zonas de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

7.- PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD

Los datos personales y de salud obtenidos de su historia clínica o equivalente serán incorporados y tratados en una base de datos que cumple con las garantías que establece la legislación sanitaria y sobre protección de datos de carácter personal.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

Es posible que en el desarrollo de un proyecto de investigación se genere mucha información genética de sus muestras. Si los resultados fueran relevantes desde el punto de vista científico, la información obtenida, desligada de cualquier dato que pueda permitir su identificación por medios razonables, podría ser remitida para su inclusión en bases científicas y demás medios de difusión de contenido científico a los que tendrán acceso, con carácter restringido, investigadores científicos.

El biobanco en el que se custodiarán sus muestras forma parte de la Red Valenciana de Biobancos cuya coordinación es llevada a cabo por el Centro Superior de Investigación de Salud Pública de la Comunitat Valenciana.

Como consecuencia de lo anterior, el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos, esto es, el Centro Superior de Investigación en Salud Pública de la Comunitat Valenciana, tendrá acceso a sus datos personales y a la información clínica asociada a la muestra donada voluntariamente, con el único fin de cumplir con las labores atribuidas a la Red Valenciana de Biobancos en virtud de la legislación vigente. En particular, el eventual acceso a sus datos personales por parte de la Red Valenciana de Biobancos tendrá como finalidad poder coordinar de la manera más eficiente posible desde el punto de vista científico la información obtenida por los biobancos adscritos a la Red Valenciana de Biobancos, mediante la gestión y coordinación del Sistema de Gestión de la Información de la Red Valenciana de Biobancos, así como la coordinación de las actividades desarrolladas por los biobancos, todo ello de acuerdo con la normativa aplicable.

Podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, para lo cual tiene en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Centro responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.



8. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

EJEMPLAR PARA EL CENTRO

D./D^a [redacted] de [redacted] años de edad, con domicilio en [redacted]
 [redacted]
 , DNI [redacted] y nº de SIP [redacted]
 D./D^a [redacted] de [redacted] años de edad, con domicilio en [redacted]
 [redacted]
 , DNI [redacted] en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del
 paciente [redacted]
 con DNI [redacted] y nº de SIP [redacted]

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
 He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.
 He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.
 He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.
 He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
 Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de [redacted]
 Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas: [redacted]
 [redacted]

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de Investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.
 Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

Aceptación por el donante Fdo.: D./D ^a [redacted] DNI [redacted]	Aceptación por el profesional Fdo.: D./D ^a [redacted] DNI [redacted] Colegiado Nº [redacted] En condición de [redacted]
En [redacted] a [redacted] de [redacted] de 20 [redacted]	



9. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Revoco el consentimiento prestado en fecha [redacted] de [redacted] de 20[redacted] y no deseo proseguir la donación voluntaria que doy con esta fecha por finalizada.

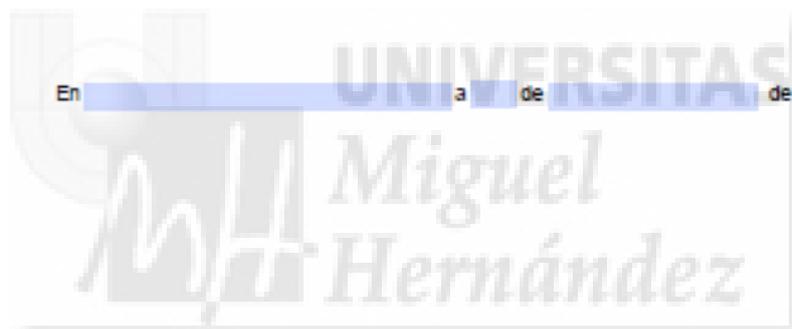
A completar por el donante

Fdo.: D./D^a
DNI: [redacted]

A completar por el profesional
destinatario

Fdo.: D./D^a
DNI: [redacted]
Colegiado N^o: [redacted]
En condición de: [redacted]

En [redacted] a [redacted] de 20[redacted]



ANEXO VI: FUENTES DE FINANCIACIÓN



FUNDACIÓN NAVARRO-TRIPODI

Alicante, 26 de Marzo de 2014

Dr. D. Pedro Alcalá Minagorre
C/ Mayor nº 26-1º
SAN VICENTE DEL RASPEIG
03690 ALICANTE

Estimado Dr. Alcalá:

En nombre del Patronato de la Fundación Bienvenida Navarro-Luciano Tripodi", me es grato comunicarle que **le ha sido concedida una ayuda de investigación** para su proyecto **"ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DE VIAS RESPIRATORIAS EN PACIENTES PEDIATRICOS CON FIBROSIS QUISTICA MEDIANTE SECUENCIACION MASIVA Y SU RELACION CON DISTINTAS VARIABLES CLINICAS."**, por un importe total de 3.000 €.

En su caso, le rogamos nos comunique por escrito, si así lo decide, la no aceptación de la misma, en el plazo improrrogable de 15 días desde la fecha de la presente.

En caso no recibir por su parte, notificación por escrito en éste sentido, entenderemos que acepta la ayuda, y le rogamos se ponga en contacto con la administración de la Fundación en el teléfono 966.592.988, de lunes a viernes de 10 a 14 horas, expresando Vd. su aceptación y acordando con Dª Concepción Cortés, lo preciso para percibir el primer tercio de la beca concedida.

El segundo tercio se le abonará cuando recibamos, a finales de 2014, el informe preceptivo respecto a la evolución y resultados preliminares de su trabajo, y el último tercio al presentar la memoria final del proyecto concluido, que en ningún caso será posterior al 1º de Junio de 2015.

Con nuestra más cordial felicitación, reciba un cordial saludo.

Fdo.: Eduardo van der Hofstadt Román.
- Secretario -

Plaza Ruperto Chapí, 1 - Entlo. B • Telf. 966 59 29 88 • Fax 966 59 29 89
e-mail: correo@navarrotripodi.org • 03001 ALICANTE



ANEXO VII: COMUNICACIONES A CONGRESOS

COMUNICACIONES ORALES A CONGRESOS NACIONALES:

*A. Sánchez Bautista**, *Pedro J. Alcalá Minagorre**, *I. García-Heredia**, *Antonio Galiana**,
*N. Marco-Guzmán**, *Gloria García Hernández***, *Carmen Luna Paredes***, *JC Rodríguez**

*Hospital General Universitario de Alicante;

** Hospital Universitario Doce de Octubre. Madrid

“Estudio de la microbiota de las vías respiratorias inferiores de pacientes pediátricos con fibrosis quística en relación con distintas variables clínicas”

XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Barcelona, Mayo 2016





CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Organizador del XX Congreso SEIMC 2016, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

CERTIFICA QUE:

A. Sanchez-Bautista, P.J. Alcalá Minagorre, I. García-Heredia, A. Galiana, N. Marco-Guzmán, G. García Hernández, C. Luna Paredes, J.C. Rodríguez Díaz

han realizado la presentación ORAL de la comunicación con título:

"Estudio de la microbiota de las vías respiratorias inferiores de pacientes pediátricos con fibrosis quística en relación con distintas variables clínicas."

en el XX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Barcelona, del 26 al 28 de mayo de 2016.

Y para que conste se expide el presente certificado en Barcelona a 28 de mayo de 2016.

Dr. José María Miró Meda
Presidente del Comité Organizador

