

Universidad Miguel Hernández de Elche
Departamento de Medicina clínica



Análisis Metagenómico de la Microbiota
Respiratoria en Pacientes con Enfermedad
Pulmonar Obstruktiva Crónica

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por Estefanía Aguirre Díaz para
optar al grado de Doctor en Investigación Clínica

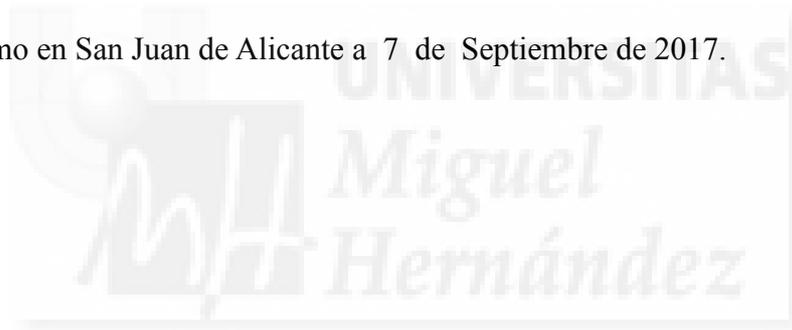
Elche, 2017

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

AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo “Análisis Metagenómico de
la Microbiota Respiratoria en Pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva
Crónica” presentado por D. Estefanía Aguirre Díaz bajo la dirección de la Dr. Don. Juan
Carlos Rodríguez Díaz

Lo que firmo en San Juan de Alicante a 7 de Septiembre de 2017.



Prof. J. Fernández

Director

Dpto. Medicina Clínica

CERTIFICAN:

Que el trabajo “Análisis Metagenómico de la Microbiota Respiratoria en Pacientes con
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
realizado” por D. Estefanía Aguirre Díaz 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 7 de
Septiembre de 2017 .



Fdo. Dra. Dña.
Directora
Tesis Doctoral

Fdo. Dra. Dña.
Directora
Tesis Doctoral

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han sido presentados en diversos congresos de carácter nacional, y han dado lugar a dos publicaciones en revistas internacionales.

Publicaciones:

- Estefanía Aguirre, Antonio Galiana, Juan-Carlos Rodríguez, Alejandro Mira, Juan Luis García-Rivero, Antonio Valero-Marco, Francisco López, Juana Llaveró, Inmaculada Candela, Manuel Sánchez, Laura Sánchez-Guillén, Montserrat Ruiz-García, Pilar López, Eduardo García Pachón, Miguel Santibáñez and Gloria Royo. Analysis of microbiota in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *APMIS* 2015; 123:427-432

- Antonio Galiana, Estefanía Aguirre, Juan Carlos Rodríguez, Alex Mira, Miguel Santibáñez, Inmaculada Candela, Juana Llaveró, Francisco López, Montserrat Ruiz, Eduardo García-Pachón, and Gloria Royo. Microbiota of Expectorated Sputum in Stable Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *European Respiratory Journal*. ERJ 2013; as doi:10.1183

Congresos:

- Ausencia de colonización por micobacterias no tuberculosas en pacientes con EPOC: estudio mediante metagenómica. XVI Reunión del Grupo Español de Micobacterias (GEM). Marzo 2012. Córdoba.

- Caracterización de la flora anaerobia del tracto respiratorio de pacientes con EPOC: mediante metagenómica. XVI Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Mayo 2012. Bilbao.

- Comparación de los métodos clásicos de cultivo y las técnicas metagenómicas en la caracterización de la flora del tracto respiratorio de pacientes con EPOC. XVI Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Mayo 2012. Bilbao.

- Actinomyces y Pneumocystis como marcadores biológicos de gravedad en pacientes con EPOC: análisis mediante secuenciación masiva (pirosecuenciación). XV Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2014 Valencia.

- Aplicación de técnicas metagenómicas al estudio de la flora respiratoria de pacientes con EPOC de diferente gravedad. XV Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Junio 2011. Málaga

AGRADECIMIENTOS:

En realidad son muchas las personas a las que tengo que agradecer la presente tesis. Después de escribir toda la tesis, pensaba que este apartado sería lo más fácil de redactar, pero ahora me doy cuenta de lo difícil que es expresar toda la gratitud que siento hacia la gente que ha estado a mi alrededor todo este tiempo, y muy especialmente en los últimos tiempos. El camino no lo vamos a negar ha sido muy arduo, sin embargo el resultado ha merecido la pena.

Me gustaría agradecer a Juan Carlos Rodríguez y Gloria Royo la posibilidad que me brindaron de iniciar este proyecto de tesis.

Agradecer también, muy especialmente la inestimable ayuda de Antonio Galiana, con quien he pasado muchos momentos de histeria en el laboratorio. Le doy gracias por haberme soportado a lo largo de tantos y tantos años. Y especialmente gracias por quedarte conmigo y ayudarme tanto en este enigmático camino que es la ciencia. Sin ti esta tesis no hubiese sido posible. También un agradecimiento muy especial, a Victoria Sánchez, quien me ha dado los empujoncitos necesarios, tanto como para empezar y como para acabar este proyecto de investigación. Tú fuiste quien me introdujo en el maravilloso mundo de la microbiología y de la investigación. Y sobretodo, gracias por estar siempre a mi lado y darme tan buenos consejos.

Mil gracias al Colegio Profesional de Técnicos Superiores Sanitarios de la Comunidad Valenciana, por abrirme las puertas y ayudarme con mucho apoyo moral a mi pesimismo. Muy especialmente gracias a Nieves Berenguer y Juan Felipe Rodríguez, quienes han soportado mi nerviosismo escéptico en cuanto a acabar la tesis y que me han animado tanto en estos momentos finales de mi tesis.

Muchos aspectos de esta tesis no hubiesen sido posible tampoco, sin el personal de laboratorio de microbiología del Hospital General Universitario de Elche. Y también gracias al personal que no es del laboratorio (Eduardo García-Pachón, Juana Llaveró, Inmaculada Candela...), quienes han colaborado en la medida de lo posible a que esta tesis sea efectiva.

Por supuesto agradecer a mi familia, pues es vuestro cariño y la educación que he recibido la que ha obrado esto. Y sobretodo dar las gracias, a una de las personas más importantes de mi vida, David, que es la que realmente me conoce y me comprende, y que siempre ha estado apoyándome moralmente en esta ardua tarea y me ha hecho las críticas oportunas cuando he bajado la guardia.

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda incondicional (que son muchas más que las que menciono aquí), apoyo y comprensión me alentaron y guiaron a lograr esta hermosa realidad que parecía imposible. Gracias por confiar en mi.

“La perseverancia no es una carrera, sino muchas carreras cortas, una tras otra.”

Walter Elliot



ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)	2
1.1. FISIOPATOGENIA DE LA EPOC	8
1.2. FACTORES DE RIESGO DE LA EPOC	11
1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA EPOC	12
1.3.1. PREVALENCIA	12
1.3.2. MORBILIDAD	14
1.3.3. MORTALIDAD	14
1.4. TRATAMIENTO DE LA EPOC	15
1.4.1. FENOTIPOS EPOC	15
1.4.2. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO	16
1.4.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	16
1.4.3.1. ANTIBIÓTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS EXACERBACIONES DE LA EPOC	20
1.4.3.2. ANTIBIÓTICOS PARA PREVENIR EXACERBACIONES DE LA EPOC	24
1.4.3.3. VACUNAS	27
2. MICROBIOMA DEL PULMÓN	28
2.1. CONCEPTOS INICIALES	28
2.2. MÉTODOS USADOS EN EL ANÁLISIS DEL MICROBIOMA DEL PULMÓN	29
2.3. MICROBIOMA DEL PULMÓN PACIENTES SANOS Y SUS DETERMINANTES	33
2.4. ROL DEL MICROBIOMA EN LA EPOC	37
2.4.1. MICROBIOMA EN PACIENTES ESTABLES	37
2.4.2. MICROBIOMA EN LAS EXACERBACIONES	43
2.4.3. POSIBLES ROLES DE LA MICROBIOTA RESPIRATORIA NO BACTERIANA EN LA EPOC	46
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	49
JUSTIFICACIÓN	50

OBJETIVO GENERAL	51
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	<u>52</u>
1. MATERIAL: REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS UTILIZADOS	53
1.1. REACTIVOS	53
1.1.1 PRIMERS Y SONDAS	54
1.2. MATERIAL INVENTARIABLE Y EQUIPOS	57
1.3. MATERIAL FUNGIBLE	57
2. MÉTODOS	58
CAPÍTULO I: SELECCIÓN DE LOS PACIENTES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	58
CAPÍTULO II: CONSIDERACIONES ÉTICAS DEL ESTUDIO	60
CAPÍTULO III: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ESPUTO PARA EL CULTIVO CUANTITATIVO	61
1. Fundamento	61
2. Cultivo Cuantitativo: método de las diluciones seriadas	62
3. Extracción de ADN mediante método Chelex-100	64
4. Amplificación por PCR previa a la secuenciación parcial del 16S ARNr	64
5. Secuenciación parcial del ARNr16s (secuenciación Sanger)	65
6. Análisis de la secuencia	67
CAPÍTULO IV: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA PIROSECUENCIACIÓN PARA EL ESTUDIO METAGENÓMICO	68
1. Fundamento	68
2. Extracción de ADN previa la pirosecuenciación	68
3. Preparación de la librería de amplicones	69
3.1. Amplificación previa a la pirosecuenciación	69
3.2. Visualización en gel de agarosa	70
3.3. Pirosecuenciación Método de 454 Life Sciences	70
3.3.1. Purificación de producto de la PCR	70

3.3.2. Proceso de amplificación en emulsión (emPCR)	71
3.3.3. Secuenciación masiva de DNA	72
3.4. Análisis bioinformático y asignación de los OTUs	74
4. Determinación de la carga bacteriana total	76
<u>RESULTADOS</u>	80
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	81
2. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA DEL PULMÓN EN PACIENTES CON EPOC: COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE CULTIVO Y PIROSECUENCIACIÓN	82
3. MICROBIOTA EN ESPUTO EN PACIENTES MODERADOS FRENTE A SEVEROS EN PACIENTES CON EPOC ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD: ALFA- DIVERSIDAD Y BETA-DIVERSIDAD	89
<u>DISCUSIÓN</u>	93
<u>CONCLUSIONES</u>	106
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	108

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

mMRC: *Modified Medical Research Council*

CAT: Cuestionario para la evaluación de la EPOC

GOLD: *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*

VEF₁: Volumen Máximo de aire espirado en el primer segundo

CVF: Capacidad Vital Forzada

PEF: Flujo Espiratorio Máximo

ATS: *American Thoracic Society*

CDi: Glucocorticoides inhalados

IMC: Índice de Masa Corporal

OMS: Organización Mundial de la Salud

PD4: Inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 4

LABA: *Long-acting beta₂-agonists* o Beta- agonista de acción larga

LAMA: *Long-acting muscarinic antagonists* o Antimuscarínico de acción larga

SAMA: *Short-acting muscarinic antagonists* o Antimuscarínicos de acción corta

AMPc: Adenosina Monofosfato cíclico

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa mediante retrotranscripción inversa cuantitativa

ITS: Secuencia espaciadora de transcripción interna

EAEPOC: Exacerbaciones agudas de la Enfermedad Pulmonar Obstrutiva Crónica

EMB: Agar Eosina-Azul-Metileno

BCYE: Agar Extracto de Levadura

T_m: Temperatura *melting*

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

ddNTPs: Dideoxinucleótidos

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

BLAST: *Basic Local alignment Search Tool*

MID: *multiplex identifier*

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

IC: Índice de confianza

RR: Riesgo relativo

PULSE: *Pulsed moxifloxacin Usage and its Long term impact on reduction of Subsequent Exacerbation*

ADN: Ácido desoxirribonucleótido

ARNr: Ácido ribisómico ribosómico

OTU: *Operational taxonomic unit*; Unidad taxonómica operacional

RDP: *Ribosomal Database Project*

LBA: Lavado Broncoalveolar

ATP: Adenosín trifosfato

MPP: Microorganismos potencialmente patógenos

nMPP: Microorganismos potencialmente no patógenos

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

IL: Interleucina

PCoA: Análisis de las coordenadas principales

FAM: 6-carboxifluoroscceína

DE: Desviación Estándar

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

QHIME: *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cambios en la remodelación pulmonar: cambios en el calibre interior de las vías respiratorias.

Figura 2: Mecanismos subyacentes al desarrollo de la EPOC.

Figura 3: Resumen etiología, fisiopatología y patología de la EPOC

Figura 4: Comparación de la Prevalencia entre el estudio IBERPOC y EPISCAN

Figura 5: Representación del gen 16S ARNr con sus regiones variables (v) y conservadas (c).

Figura 6: Inferencia filogenética de probabilidad máxima de *Archaea* y *Bacteria*.

Figura 7: Determinantes del microbioma respiratorio.

Figura 8: Potencial papel de la microbiota bacteriana en la patogénesis de la EPOC.

Figura 9: Representación de los mecanismos propuestos para explicar como el virus *influenza* favorece el crecimiento bacteriano.

Figura 10: *Gram* de esputo.

Figura 11: Esquema de la secuenciación Sanger.

Figura 12: Esquema de la PCR en emulsión en el proceso de pirosecuenciación.

Figura 13: Esquema de la secuenciación de nueva generación por el método de *Roche*.

Figura 14: Representación de la fluorescencia frente al número de ciclo en la que se ha detectado.

Figura 15: Representación esquemática de un ensayo de RT-PCR usando el método *Taqman*.

Figura 16: Composición relativa de los géneros en moderados (M) y severos (S) en los pacientes con EPOC

Figura 17: Composición bacteriana a nivel de filo en pacientes con EPOC moderada y grave.

Figura 18: Curvas de rarefacción y carga bacteriana para todas las muestras, agrupadas en las categorías moderada y grave.

Figura 19: Perfiles taxonómicos bacterianos por género y agrupamiento de muestras por composición de similitud.

Figura 20: Análisis de coordenadas principales 2D.

Figura 21: Heterogenicidad en cuanto secciones pulmonares de la microbiota en la mucosa bronquial en pacientes de severos de EPOC.

Figura 22: Inflamación inducida por patógenos dominantes y efectos sobre la microbiota.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de la gravedad de la obstrucción bronquial y de la severidad clínica de la Enfermedad Obstructiva Crónica (EPOC).

Tabla 2: Índice CAT adaptado según la guía GOLD 2017.

Tabla 3: Índice BODEx según la Guía Española GespEPOC.

Tabla 4 : Terapia fenotípica específica de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

Tabla 5: Glosario de los términos más utilizados en el presente estudio.

Tabla 6: Taxonomía de los filos y los géneros más descritos en los estudios del microbioma del pulmón humano

Tabla 7: Microbioma respiratorio en personas sanas, en pacientes estables con EPOC, y en pacientes con exacerbaciones de EPOC.

Tabla 8: Características socio-demográficas individuales de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 9: Reactivos utilizados en la PCR previa secuenciación

Tabla 10: Cantidades de los reactivos utilizados en la *Master Mix* para la amplificación previa a la pirosecuenciación

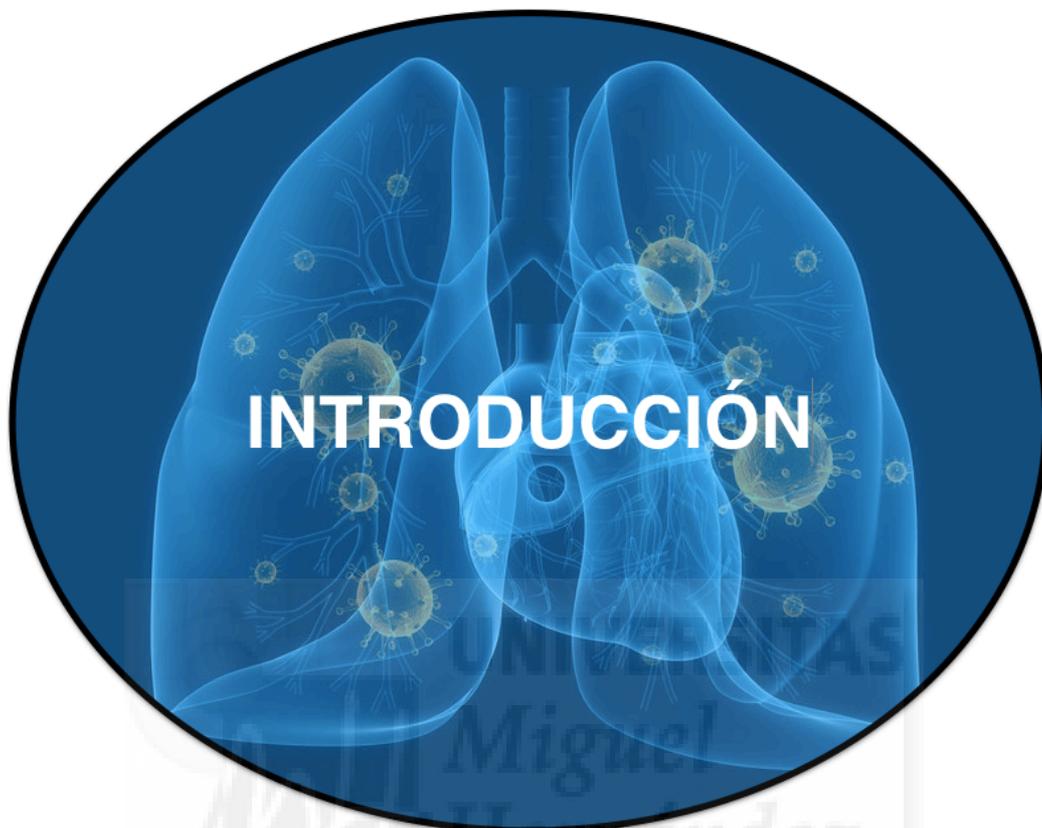
Tabla 11: Características clínicas de base de los pacientes.

Tabla 12 a: Géneros obtenidos en cultivo cuantitativo (UFC/ml de esputo) desglosados individualmente paciente en estadio moderado (graves-muy graves)

Tabla 13: Principales filos hallados en cultivo convencional y en pirosecuenciación.

Tabla 14: Principales géneros en cultivo convencional y en pirosecuenciación.

Tabla 15: Distribución de géneros en recuento porcentual y en n° de pacientes, comparando los dos grupos establecidos de estadio de EPOC, pacientes moderados y graves-muy graves.



UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

➤ 1. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC).

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica es una alteración inflamatoria prevenible y tratable. Se caracteriza por una obstrucción persistente del flujo aéreo, por lo general progresiva y en parte reversible. Esta limitación crónica del flujo aéreo se relaciona con una reacción inflamatoria pulmonar excesiva, en especial al humo del tabaco y/o la biomasa. Además, puede estar o no acompañada de síntomas (disnea, tos y expectoración), exacerbaciones, efectos extrapulmonares y enfermedades concomitantes. Para la valoración de estos síntomas se cuenta con instrumentos estandarizados, de autoaplicación sencilla, que permiten valorar con rapidez los síntomas (disnea), utilizando mMRC, (Fletcher 1960) *Modified Medical Research Council* que valora la disnea en reposo y predice los riesgos mortalidad (Sundh y col. 2012, Nishimura y col. 2002). Se ha observado que esta escala se correlaciona de forma adecuada con la capacidad de ejercicio y cuestionarios de calidad de vida, sobre todo cuando se obtiene una calificación >2. Otro cuestionario de valoración de síntomas y calidad de vida de evaluación de EPOC, que se conoce es el CAT (*COPD Assessment Test*) (Jones, 2001). Esta es una prueba de valoración integral de síntomas y calidad de vida de la EPOC. El CAT cuenta con ocho aspectos de medición unidireccional que valoran la alteración del estado de salud en la EPOC.

Las exacerbaciones y comorbilidades de esta enfermedad contribuyen a la gravedad en cada paciente de forma individual. Una exacerbación de EPOC se define en la iniciativa GOLD 2017 como un episodio agudo caracterizado por un empeoramiento de los síntomas respiratorios ya descritos que conduce a un cambio en el tratamiento y que requiere una intervención o modificación farmacológica, como la prescripción de antibióticos y corticosteroides sistémicos.

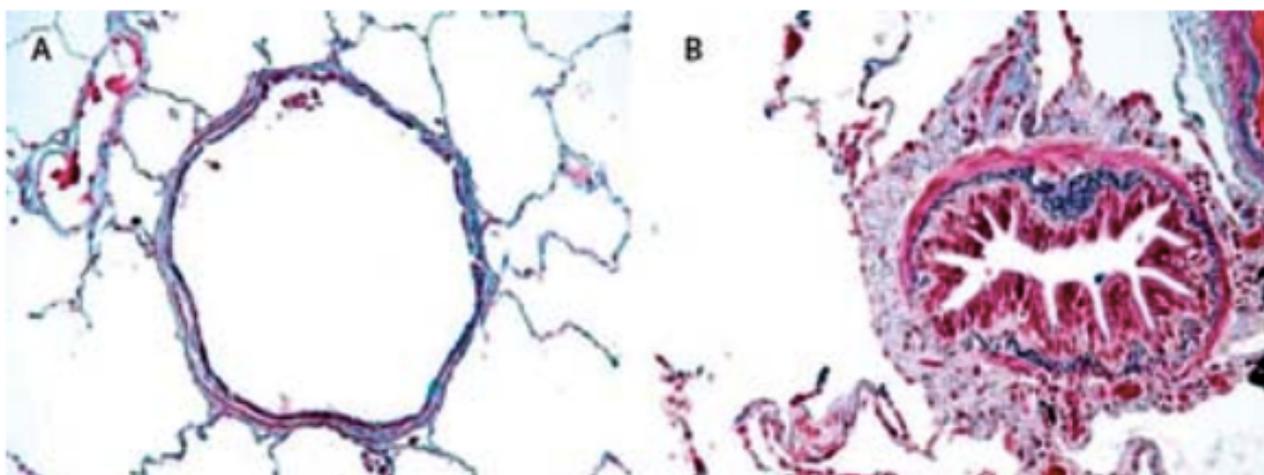


Figura 1: Cambios en la remodelación pulmonar: cambios en el calibre interior de las vías respiratorias.

A) persona sana B) persona con EPOC

La obstrucción crónica al flujo aéreo típica de esta afección es resultado de una combinación en grado variable de enfermedad de la vía respiratoria pequeña (bronquiolitis obstructiva) y destrucción del parénquima pulmonar (enfisema pulmonar), que resulta de la inflamación crónica. Esta inflamación provoca cambios estructurales de remodelación permanentes que dan origen al engrosamiento de la pared bronquial y así como de la pared bronquiolar, lo que conlleva una disminución de su calibre y pérdida de las paredes alveolares, junto a pérdida de las ataduras alveolares hacia la superficie externa de las vías respiratorias, lo que reduce la retracción elástica pulmonar y produce incapacidad de mantener abiertas las vías respiratorias durante la espiración (Figura 1). Todos estos cambios se pueden medir por medio de la espirometría, el cual es un estudio disponible en muchos centros sanitarios, y siempre y cuando se cumpla con una serie de requisitos, es capaz de reproducir la función pulmonar de cada paciente (Buist y col. 2007). Por tanto, para establecer el diagnóstico de la EPOC es indispensable realizar una espirometría antes y después del broncodilatador y la característica funcional esencial en estos pacientes es la obstrucción persistente al flujo aéreo, la cual se valora con la relación VEF_1/CVF disminuida. La iniciativa GOLD utiliza la relación $VEF_1/CVF < 70\%$ post-broncodilatador diagnosticar a un sujeto de EPOC. El grado de obstrucción se determina mediante el VEF_1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo). La *American Thoracic Society* (ATS) y la SEPAR definen la reversibilidad como un aumento agudo del VEF_1 después de una dosis de β -2-agonista inhalado (400 μ g de salbutamol) superior al 12% y 200 mL por encima del valor previo de VEF_1 . Los criterios espirométricos para el diagnóstico de la EPOC se muestran a continuación en la siguiente tabla:

Grado de obstrucción	Severidad de la obstrucción VEF ₁ *post-broncodilatador	Severidad clínica de EPOC
I. Leve	≥ 80%	Buena calidad de vida (CAT<10), sin exacerbaciones frecuentes y >50% VEF ₁
II. Moderada	50% ≤ VEF ₁ < 80%	Uno de los siguientes puntos; <input checked="" type="checkbox"/> VEF ₁ < 50%
III. Grave	30% ≤ VEF ₁ < 50%	<input checked="" type="checkbox"/> Al menos 2 exacerbaciones / año o una hospitalización / año a causa de EPOC <input checked="" type="checkbox"/> La EPOC tiene un impacto nmedio en la calidad de vida CAT ≥ 10 o causa una mala calidad de vida o perjudica a la tolerancia de los ejercicios
IV. Muy grave	VEF ₁ < 30%	Uno de los siguientes puntos; <input checked="" type="checkbox"/> VEF ₁ < 30% <input checked="" type="checkbox"/> Fallo respiratorio crónico <input checked="" type="checkbox"/> Frecuentes exacerbaciones o hospitalizaciones a pesar del tratamiento para EPOC <input checked="" type="checkbox"/> La EPOC tiene un alto o un muy alto impacto en la calidad de vida (CAT ≥ 20) o es causa de una mala calidad de vida en cuanto a la tolerancia del ejercicio

Tabla 1: Clasificación de la gravedad de la obstrucción bronquial y de la severidad clínica de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Adaptado Kankaanranta y col. 2015.

*VEF₁: volumen espiratorio máximo en 1 segundo. En pacientes con VEF₁/CVF <0,70

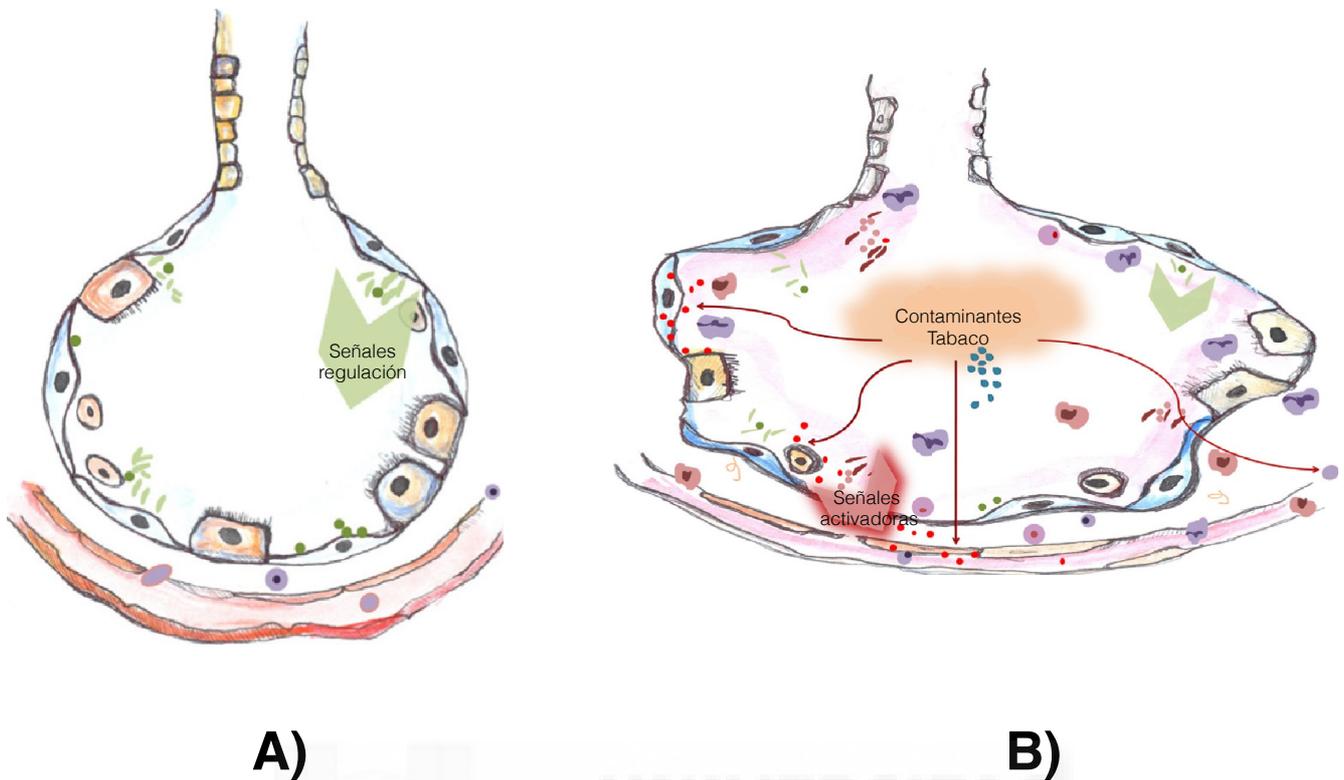
La espirometría por sí sola no puede considerarse diagnóstica, sino que debe utilizarse como prueba de confirmación ante la sospecha diagnóstica en un paciente que presenta síntomas respiratorios crónicos y es o ha sido fumador (Jackson y Hubbard 2003). En casos menos frecuentes podemos obtener una historia de exposición a otros agentes tóxicos inhalados en el hogar o en el lugar de trabajo. Por tanto, en diagnóstico de EPOC debe de incluir , a parte de la espirometría, un histórico de exposición de factores predisponentes, una evaluación física cuya principal utilidad no radica en diagnosticar la EPOC, sino en guiar la investigación siguiente, mediante exclusión o sugerencia de causas alternativas para los síntomas respiratorios del paciente, un estudio radiológico, y los ya mencionados cuestionarios de evaluación de síntomas y calidad vida (CAT y mMRC) (Kankaanranta y col. 2015).

CUESTIONARIO CAT							
Yo nunca toso	0	1	2	3	4	5	Toso todo el tiempo
No tengo flema (moco en el pecho)	0	1	2	3	4	5	Tengo el pecho lleno de flema (moco)
No siento el pecho oprimido	0	1	2	3	4	5	Siento el pecho oprimido
No me falta el aliento al subir pendientes o escaleras	0	1	2	3	4	5	Me falta el aliento al subir pendientes o escaleras
No tengo limitaciones para las tareas del hogar	0	1	2	3	4	5	Estoy totalmente limitado para las tareas del hogar
No tengo problemas para salir de casa	0	1	2	3	4	5	No me siento seguro para salir de casa
Duermo profundamente	0	1	2	3	4	5	Mi problema respiratorio me impide dormir
Tengo mucha energía	0	1	2	3	4	5	No tengo nada de energía

Tabla 2: Índice CAT. Adaptado guía GOLD 2017.

Por otro lado, y además, se debe realizar un diagnóstico diferencial entre EPOC y otras enfermedades respiratorias. Los diagnósticos diferenciales más importantes incluyen asma,

bronquitis crónica, infecciones de las vías respiratorias inferiores (incluida la tuberculosis), cáncer de pulmón, enfermedades pulmonares intersticiales y enfermedades cardíacas. Un problema diagnóstico común es distinguir entre el asma y la EPOC. La normalización de la función pulmonar por el tratamiento con CDi (glucocorticoides inhalados) excluye la EPOC salvo en estadios muy iniciales y apoya firmemente el diagnóstico de asma. Si la función pulmonar no cambia significativamente por el tratamiento con CDi, el diagnóstico más probable es la EPOC. Además de una espirometría, se recomienda incluir una radiografía de tórax en la evaluación inicial para excluir otras enfermedades como el cáncer pulmonar, la tuberculosis, la neumonía, la insuficiencia cardíaca y las enfermedades pleurales. En la EPOC leve, la radiografía de tórax es casi siempre normal. En el estadio avanzado de la enfermedad se puede observar aplanamiento de ambos hemidiafragmas, el corazón largo y estrecho, hiperinsuflación pulmonar con adelgazamiento de los vasos sanguíneos y en ocasiones se visualizan áreas de hiperclaridad pulmonar en lóbulos superiores que suelen corresponderse al hacer una tomografía axial computerizadas con áreas de enfisema pulmonar. La tomografía computarizada del tórax no es rutinariamente necesaria, pero puede utilizarse por especialistas en casos de diagnóstico diferencial problemático para detectar bronquiectasias y en la evaluación de reducción de volumen de la EPOC ya sea endoscópica o quirúrgica.



	Microbiota pulmón sano		Productos de degradación elastina
	T-reguladores y T CD4/CD8		Macrófagos
	Células mesenquimales		Neutrófilos
	Patógenos		Oxidantes
	Mediadores inflamatorios		

Figura 2: Mecanismos subyacentes al desarrollo de la EPOC. Adaptado Bagdonas y col. (2015).

A) El epitelio de las vías respiratorias compuesto por varios tipos de células mantiene una interacción equilibrada con la microbiota pulmonar normal, y sólo las señales reguladoras son inducidas. Los progenitores (células madre mesenquimales) son reclutados de la circulación cuando son necesarios. B) Las bacterias patógenas (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) activan las vías de señalización proinflamatorias en el epitelio y también liberan quimiocinas y citoquinas. Paralelamente a los contaminantes del aire, el humo del cigarrillo, los oxidantes. También inducen cambios similares (flechas rojas finas).

En otro sentido, hay que tener en cuenta que, los términos de enfisema y bronquitis crónica han caído en desuso en cierta medida porque son menos los pacientes puros con estas alteraciones, además de la presencia de ambas en mayor o menor proporción en cada enfermo: el término EPOC tiene implícitas ambas alteraciones. El enfisema se define como la pérdida de la superficie alveolar; es más bien un término histológico, pero se emplea en el terreno clínico de forma incorrecta, si bien

ahora puede considerarse como clínico con la tomografía de alta resolución. En cambio, la bronquitis crónica, definida como la presencia de tos y expectoración por cuando menos tres meses en dos años consecutivos, sí es un concepto clínico y antecede o aparece después de desarrollarse la obstrucción crónica, o bien se relaciona con la aparición o aceleración de la obstrucción fija de la vía respiratoria y puede existir ante una espirometría normal (bronquitis crónica simple).

Debido a que la EPOC es una afección multisistémica, los clínicos deben asegurarse de que en la valoración inicial del paciente se midan variables pulmonares y extrapulmonares. Por lo tanto, la determinación del VEF₁, en conjunto con la determinación de la disnea medida con la escala mMRC, el índice de masa corporal y la capacidad de ejercicio (cuantificada a través de una caminata de seis minutos), ha permitido establecer el componente pulmonar y sistémico.

Cabe destacar además que estos parámetros han permitido de manera integral elaborar un índice pronóstico de la enfermedad, el denominado BODEx.

Marcadores	Puntuación	Puntuación			
		0	1	2	3
B	IMC (Kg/m ²)	>21	≤21		
O	VEF ₁	≥65	50-64	36-49	≤35
D	Disnea (mMRC)	0-1	2	3	4
Ex	Exacerbaciones graves	0	1-2	≥3	

Tabla 3: Índice BODEx. Guía Española GespEPOC.

IMC: índice de masa corporal; mMRC: escala modificada de la MRC (*Modified Medical Research Council*)

Ex: exacerbaciones graves (se incluyen únicamente visitas a urgencias hospitalarias o ingresos). VEF₁: volumen espiratorio máximo en 1 segundo.

➤ 1.1. FISIOPATOGENIA

La inflamación de la vía respiratoria ocupa un papel relevante en la patogenia de la EPOC y normalmente se desencadena por la exposición al humo de leña y cigarro. Dicha inflamación es el efecto primordial de los linfocitos TCD8⁺, en especial Th1; su mayor presencia y actividad se relacionan con el patrón obstructivo funcional y el mayor grado de limitación al flujo aéreo. Es típico que en la EPOC se observe una relación de linfocitos CD4⁺/CD8⁺ invertida, con un número incrementado de macrófagos y neutrófilos, células de primera y segunda líneas, respectivamente, en el componente inflamatorio de la EPOC (figura 2); algunos otros mediadores

inflamatorios que participan en la patogenia son interleucina-8, interleucina-1, leucotrieno B4 e interferón gamma. De manera excepcional, las células de primera línea que pueden afectarse en la reacción inflamatoria de la EPOC son los eosinófilos; no obstante, esto señala un componente alérgico observado de manera característica en pacientes con asma, por lo cual no corresponde en forma habitual a los sujetos con EPOC. Este patrón celular se ha descrito sólo en exacerbaciones de EPOC y síndrome de superposición de asma y EPOC. Con la exposición continua a partículas tóxicas o gases, en el plano pulmonar, las células epiteliales responden con producción y liberación de mediadores inflamatorios, ya comentados, lo que provoca amplificación de dicha respuesta inflamatoria. Todo esto da lugar a la remodelación de los bronquiolos y a la enfermedad de la vía respiratoria pequeña, con fibrosis de la capa subepitelial, la adventicia y algunas porciones de las paredes alveolares cercanas a la inserción de las paredes externas de las vías respiratorias; en general, la destrucción del parénquima pulmonar es consecuencia de la liberación de proteasas (serina proteasas: catepsinas, perforinas, granzimas, elastasa de eosinófilos, metaloproteinasas, proteinasas) que en forma habitual son inhibidas por antiproteasas, como la 1-alfa- antitripsina; no obstante, en la EPOC hay una alteración o desequilibrio de este sistema llamado proteasa/ antiproteasa que culmina en la destrucción de espacios aéreos y agrandamiento de las zonas de enfisema. Es común que el estrés oxidativo se amplifique en pacientes con EPOC, con la liberación de diversos biomarcadores, como el peróxido de hidrógeno o el 8-isoprostano en el esputo y sistema circulatorio, lo que explica otro de los mecanismos de inflamación en esta enfermedad: la oxidación por radicales libres de oxígeno (Bagdonas y col. 2015).

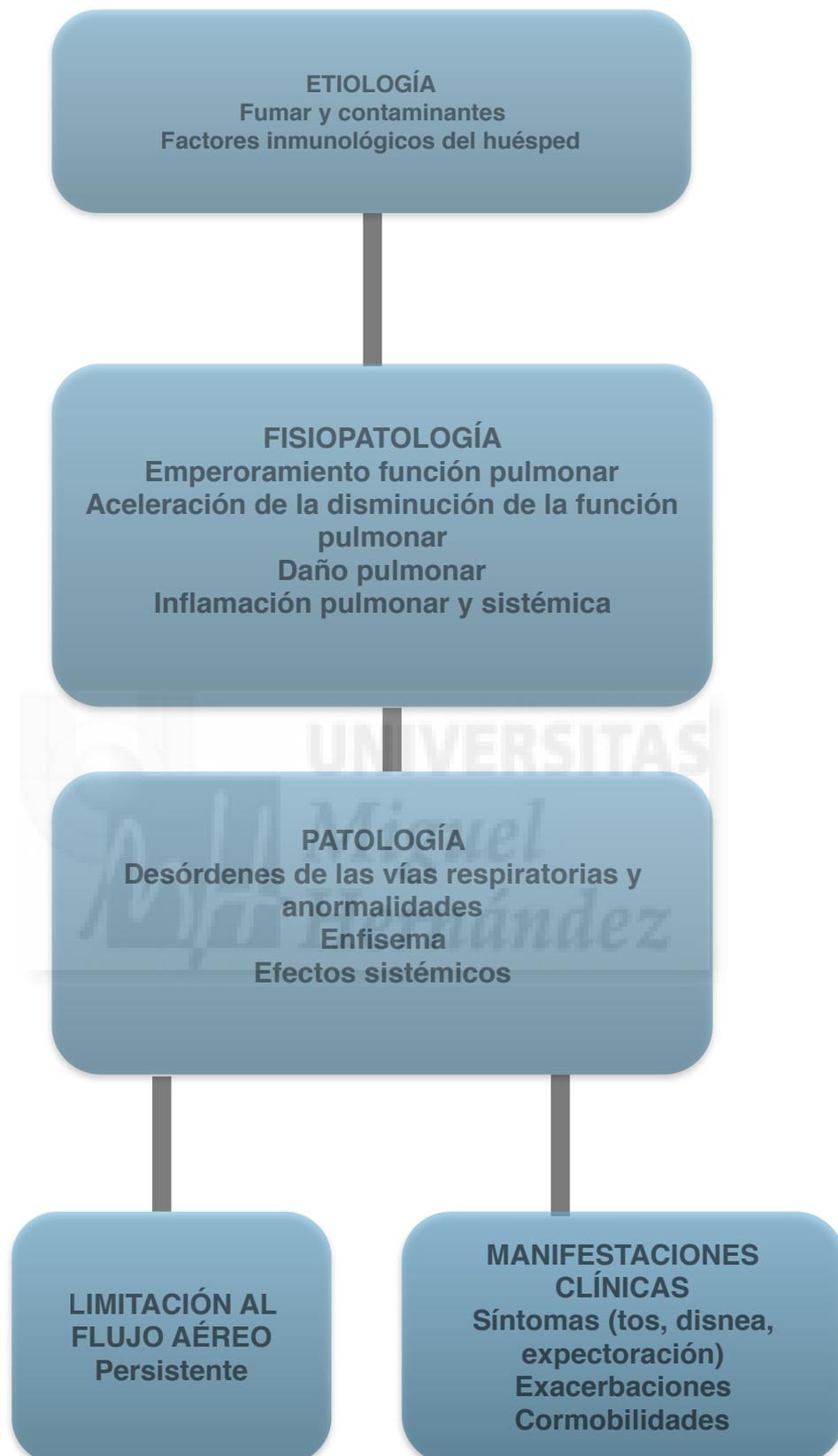


Figura 3: Resumen etiología, fisiopatología y patología de la EPOC. Adaptado Guía GOLD 2017.

➤ 1.2. FACTORES DE RIESGO DE EPOC

Las revisiones recientes concluyen que los factores de riesgo para el desarrollo de EPOC son cada vez mejor identificados e incluyen también muchas exposiciones ambientales, como la exposición ocupacional o ambiental al polvo y humos, biomasa, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Los contaminantes específicos estudiados en su relación con EPOC son el ozono, las partículas en suspensión, el monóxido de carbono (CO), el dióxido de sulfuro (SO₂), el dióxido de nitrógeno (NO₂) y otros gases (Eisner y col. 2010, Salvi y Barnes 2009).

El tabaquismo es todavía el factor más importante para ocasionar EPOC. En países desarrollados, el 73% de los que la padecen se relaciona con el hábito; en países en desarrollo la cifra es de 45% (Salvi y Barnes 2009). Esta relación tiene un factor genético importante dado que no todos los fumadores desarrollan la enfermedad, pero al menos la mitad puede hacerlo. Aún más, el tabaquismo durante el embarazo da lugar a que la función pulmonar de los niños de estas mujeres que fumaron en el embarazo tengan menor desarrollo de la función pulmonar y por tanto que lleguen a la vida adulta con mayor predisposición a la obstrucción del flujo aéreo.

La alta contaminación atmosférica (la combustión de la biomasa, es la contaminación intramuro causante de la mayor fracción de riesgo de la EPOC (Salvi y Barnes 2009)), sobre todo la asociada al tráfico rodado, el polvo y sustancias químicas ocupacionales son factores desencadenantes tanto del desarrollo de la EPOC como de la producción de exacerbaciones de EPOC en individuos susceptibles. La exposición laboral a polvos, químicos (como vapores, irritantes y humos) e infecciones respiratorias frecuentes durante la infancia (Rushton 2007).

El enfisema hereditario debido a la deficiencia de alfa-1-antitripsina es el principal ejemplo de un factor genético. El déficit congénito de alfa-1-antitripsina predispone a una disminución acelerada de la función pulmonar (Stoller y Abousouan 2005). Es, además, una enfermedad autosómica de expresión recesiva que causa EPOC y cirrosis hepática.

Otros factores de riesgo que se han descrito son la edad, el sexo, el envejecimiento pulmonar (>65 años), las infecciones respiratorias repetidas del niño o adulto en edades tempranas, tuberculosis y factores socio-económicos. La mayoría de estos factores asociados al desarrollo de EPOC no pueden ser modificados (Mannanino y Buist 2007).

➤ 1.3. EPIDEMIOLOGÍA

La EPOC es la primera causa de morbi-mortalidad mundial que produce una carga económica y social sustancial que va en aumento. Su prevalencia y morbi-mortalidad varían entre las regiones y los países, y también entre los diferentes grupos; de este modo, la prevalencia de la EPOC se relaciona de modo directo con la prevalencia de los factores de riesgo, como el tabaquismo de cada país (p. ej., Uruguay, España, Turquía y China tienen prevalencias elevadas de EPOC debido a la gran prevalencia del tabaquismo) y en otros lugares depende de la prevalencia de la exposición al humo de biomasa (como América Latina, Asia y África). Se ha considerado que la prevalencia de la EPOC se incrementará debido a la continua exposición a los factores de riesgo a través del tiempo, el cambio de la edad mundial y la transición epidemiológica de la edad, con individuos que viven más y por tanto más expuestos por mayor tiempo. En 1990, los 10 trastornos más letales del mundo fueron enfermedades cardíacas isquémicas, trastornos cerebrovasculares, infecciones respiratorias altas, enfermedades diarreicas, padecimientos perinatales, EPOC, tuberculosis pulmonar, varicela, accidentes automovilísticos y cáncer de pulmón; en consecuencia, la EPOC es la sexta causa de muerte. Para el 2020 se prevé que la EPOC será la tercera causa de muerte, precedida por las enfermedades isquémicas y cardiovasculares.

➤ 1.3.1. PREVALENCIA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que actualmente hay 210 millones de personas en el mundo que presentan EPOC (Bousquet y col. 2010). En el estudio *The Global Burden of Disease* publicado en 1996, la OMS cifraba las tasas de prevalencia mundial de la EPOC en el año 1990 en 9,3 casos/1.000 habitantes en los hombres, y en 7,3 casos/1.000 habitantes en las mujeres (Buist y col. 2007). En una revisión sistemática se estima que la prevalencia de EPOC en la población general es de alrededor del 1% en todas las edades, incrementándose al 8-10% o superior en aquellos adultos de 40 años o más (Halbert y col. 2006). En Europa, según los resultados de una revisión sistemática, la prevalencia varía entre el 2,1 y el 26,1%, dependiendo del país, los diferentes métodos utilizados para estimar la prevalencia en términos de definición, las escalas de gravedad y los grupos de población (Atsou y col. 2011).

En España, hasta hace poco, el único estudio de prevalencia de EPOC y ámbito nacional disponible era el IBERPOC, realizado en 1997 para medir la prevalencia y la variación de la distribución de la EPOC en siete zonas geográficas. La prevalencia de EPOC (definida según los criterios antiguos de la *European Respiratory Society* como cociente posbroncodilatador $VEF_{1,1}/$

CVF < 88% del teórico en hombres y < 89% en mujeres) fue del 9,1% (el 14,3% en hombres y el 3,9% en mujeres) (Sobradillo-Peña y col. 2000). Según el hábito tabáquico, la prevalencia fue del 15,0% en fumadores, del 12,8% en ex-fumadores y del 4,1% en no fumadores. El estudio IBERPOC encontró, además, diferencias muy importantes según el área geográfica, desde sólo el 4,9% en Cáceres hasta el 18% en Manlleu (Barcelona), posiblemente relacionadas con factores ambientales o laborales no estudiados. En este sentido, el exceso de casos detectado en algunas áreas geográficas solía corresponder a mujeres mayores de 55 años, no fumadoras, con antecedentes de enfermedades respiratorias en la infancia y que no presentaban síntomas de expectoración o sibilantes (Miravittles y col. 2005). Un aspecto muy importante de los resultados del estudio IBERPOC fue el alto grado de infradiagnóstico, pues el 78,2% de los casos confirmados por espirometría no tenían diagnóstico previo de EPOC.

Desde hace poco se dispone de nuevos datos de la distribución actual de la EPOC en España, obtenidos del estudio EPI-SCAN (Miravittles y col. 2009). Las áreas participantes fueron Barcelona, Burgos, Córdoba, Huesca, Madrid, Oviedo, Sevilla, Requena (Valencia), Vic (Barcelona) y Vigo (Pontevedra). La prevalencia actual de EPOC, definida por el criterio GOLD como un cociente $FEV_1/FVC < 0,70$ posbroncodilatador en la población de 40-80 años fue del 10,2% (el 15,1% en hombres y el 5,7% en mujeres). Comparado con el estudio IBERPOC, el infradiagnóstico de EPOC en España se redujo sólo levemente del 78 al 73%, aunque sí se apreció una gran reducción del infratratamiento de la EPOC en España dentro de este marco de 10 años, del 81 al 54% ($p < 0,05$) (Soriano y col. 2010).

Actualmente, y según EPI-SCAN, se estima que 2.185.764 españoles presentan EPOC de entre los 21,4 millones con edad entre 40 y 80 años. Por sexos, las cifras corresponden a 1.571,868 hombres y 628,102 mujeres. Y ya que el 73% aún no está diagnosticado, puede decirse que más de 1.595,000 españoles aún no lo saben y, por tanto, no reciben ningún tratamiento para su EPOC.

Prevalencia de la EPOC en España

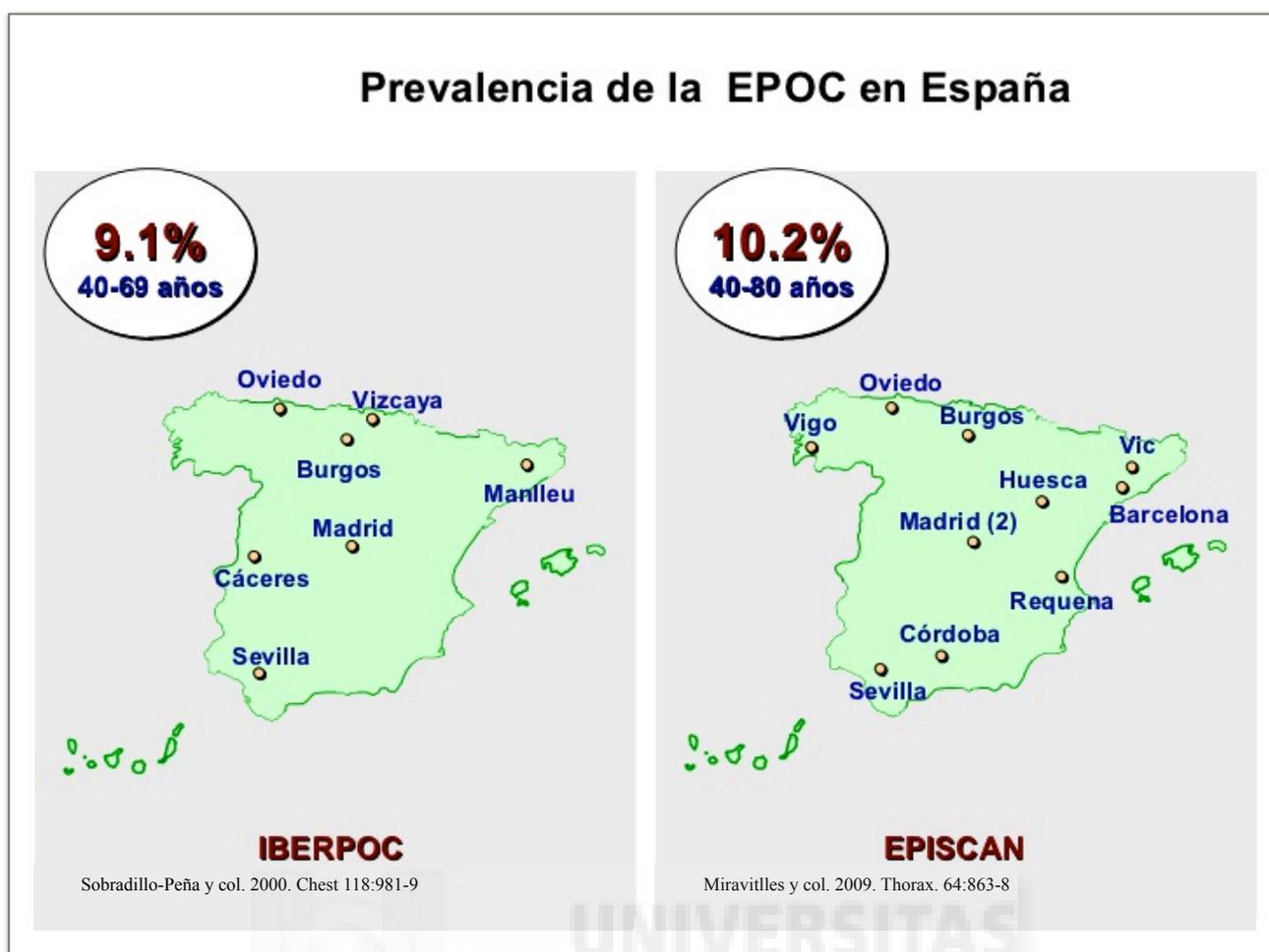


Figura 4: Comparación de la prevalencia entre estudio IBERPOC y EPISCAN

⇒ 1.3.2. MORBILIDAD

La morbilidad de la EPOC aumenta junto con la de otras enfermedades crónicas (cardiovasculares, musculoesqueléticas, *diabetes mellitus*) y puede tener un efecto en el estado de salud de los pacientes e interferir con su tratamiento.

⇒ 1.3.3. MORTALIDAD

La EPOC es actualmente la cuarta causa de muerte en el mundo y la OMS estima que será la tercera en el año 2030. En el año 2008, las enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores representaron la cuarta causa de muerte en España (responsables del 11,4% del total de defunciones), después del cáncer (26,1%), las enfermedades del corazón (20,8%) y las enfermedades cerebrovasculares (18,2%) (Regidor y col. 2011).

La tasa de mortalidad por EPOC por 100.000 habitantes, ajustada por población mundial, en el año 2008 fue de 449,22 en hombres y 238,47 en mujeres. En hombres el intervalo de estas tasas se sitúa entre el 399,13 de Navarra y el 526,57 de Ceuta. En mujeres se sitúa entre el 205,36 de

Navarra y el 310,53 de Ceuta. Las tasas de mortalidad aumentan de manera significativa, sobre todo en hombres, a partir de los 55 años (Raziel).

La mortalidad por EPOC en España, comparando las tasas ajustadas por población mundial, muestra una tendencia a la disminución durante la última década, tanto en hombres como en mujeres (Raziel).

➤ 1.4. TRATAMIENTO DE EPOC

La elección del tratamiento debe basarse en el fenotipo clínico del paciente, y la intensidad del mismo se determinará por el nivel de gravedad multidimensional. Sin embargo, dentro de un mismo nivel de gravedad existen otros parámetros que pueden modular la intensidad del tratamiento, entre los que destacan la gravedad de los síntomas, la frecuencia e intensidad de las agudizaciones o el deterioro de la calidad de vida relacionada con la salud medida mediante el cuestionario CAT (*COPD Assessment Test*).

Los objetivos generales del tratamiento de la EPOC se resumen en cuatro (Kankaanranta y col. 2015):

- Controlar los síntomas y mejorar la calidad de vida
- Reducir futuros riesgos, especialmente las exacerbaciones
- Enlanteceer la progresión de la enfermedad
- Reducir la mortalidad

➤ 1.4.1. FENOTIPOS DE EPOC

Según la última actualización de GESEPOC (2015) se consideran tres fenotipos bien caracterizados de esta enfermedad: bajo riesgo de agudizaciones, basado en la historia de agudizaciones previa o en el grado de obstrucción pulmonar ($VEF_1 > 50\%$). Alto riesgo de agudizaciones: basado en la historia de agudizaciones previa o en la obstrucción grave al flujo aéreo ($VEF_1 < 50\%$); y el fenotipo mixto EPOC-asma (ACOS). Para la identificación de este último se han establecido unos criterios diagnósticos mayores (prueba broncodilatadora muy positiva, $+200$ ml y 15% ; eosinofilia en esputo o $FeNO > 50$ ppb; diagnóstico previo de asma de inicio antes de los 40 años) y adicionales (IgE total elevada, atopia, prueba broncodilatadora positiva repetidamente, PEF típico de asma). Para ser diagnosticado un paciente debe cumplir 2 criterios mayores o 1 mayor y 2 adicionales (Guía GESEPOC 2015).

➤ 1.4.2. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO

Existen una serie de medidas generales a tener en cuenta en todo paciente con EPOC que comprenden el abandono del tabaco, la adecuada nutrición, rehabilitación pulmonar y física (mediante actividad física regular), la evaluación y tratamiento de las comorbilidades, la vacunación, ventilación mecánica, administración de oxígeno. El tratamiento quirúrgico debe reservarse para un subgrupo de individuos muy específico, en el que se ha demostrado enfisema pulmonar que predomina en lóbulos superiores y con pobre capacidad para el ejercicio. El trasplante pulmonar es una opción sólo para una mínima porción de los pacientes con EPOC; éstos deben satisfacer criterios muy específicos y valorarse por un equipo multidisciplinario antes de someterse al trasplante (Guía GOLD 2017 y Kankaanranta y col. 2015).

➤ 1.4.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

En cuanto al tratamiento farmacológico de la EPOC, hasta la fecha no existe evidencia concluyente de ningún medicamento que modifique a largo plazo la disminución de la función pulmonar. Dichas terapias farmacológicas incluyen broncodilatadores, combinaciones de corticoides inhalados (CDi) y broncodilatadores de acción prolongada, inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (PDE4: Roflumilast) o teofilina, vacunación contra la gripe y el neumococo, antibióticos y mucolíticos.

Los broncodilatadores mejoran la obstrucción bronquial mediante la reducción de la contracción del músculo liso bronquial. Usualmente, mejoran los valores espirométricos que reflejan la obstrucción como el VEF₁.

Los broncodilatadores se pueden dividir en acción corta (duración del efecto broncodilatador generalmente 3-6 horas) y larga acción (duración del efecto broncodilatador generalmente 12-24 horas). Existen dos clases diferentes de broncodilatadores que tienen básicamente acción broncodilatadora similar en el tratamiento de la EPOC, pero con diferentes mecanismos de acción. Estas clases farmacológicas son beta-2-agonistas y los receptores muscarínicos (M1, M2 y M3) antagonistas (denominados anticolinérgicos). Ambas clases farmacológicas contienen preparaciones de acción corta y de acción prolongada. Los broncodilatadores generalmente se administran según sea necesario (usualmente preparaciones de acción corta) o regularmente (usualmente preparaciones de acción prolongada) para tratar o prevenir la aparición de síntomas (Kankaanranta y col. 2015).

Según la última actualización de la iniciativa GOLD 2017, en cuanto a la terapia combinada broncodilatadora, existen numerosas combinaciones de beta-agonistas de acción larga (LABA) y

antimuscarínicos de acción larga (LAMA) en un solo dispositivo. Estas combinaciones han mostrado mejorar la función pulmonar comparado con placebo y esta mejoría es consistentemente mayor que los efectos de la monoterapia broncodilatadora de acción larga, aunque la magnitud de la mejoría es menor que los efectos aditivos predichos para cada componente individual.

La mayoría de los estudios con la combinación LABA/LAMA se han hecho en pacientes con tasas bajas de exacerbaciones. Un estudio en pacientes con historia de exacerbaciones indicó que la combinación es más efectiva que la monoterapia para prevenir las exacerbaciones (Mahler y col. 2015). Otro estudio en pacientes con historia de exacerbaciones, confirmó que la combinación LABA/LAMA disminuye las exacerbaciones en mayor cuantía que la combinación corticoides inhalados (CDi)/LABA (Aaron y col. 2007).

En cuanto al uso de la combinación CDi/LABA, en pacientes con EPOC moderado a muy severo y exacerbaciones, el uso de esta combinación es más efectiva que los monocomponentes en la mejoría de la función pulmonar, estado de salud y disminución de las exacerbaciones (Nannini y col. 2012 y 2013). Análisis post hoc de varios estudios sugieren que el recuento de eosinófilos es esputo y sangre podría servir como biomarcador para predecir la eficacia de los CDi en la prevención de exacerbaciones, pero debido a la falta de evidencias claves, no se puede recomendar su uso por el momento en la práctica diaria.

En cuanto al aumento en el desarrollo de neumonía con el uso de CDi, hay evidencias que sugieren que un recuento de eosinófilos en sangre $<2\%$ aumenta el riesgo de desarrollar neumonía. Resultados de estudios randomizados y controlados han mostrado variables datos sobre en riesgo de osteopenia y fracturas con el uso de CDi (Yang y col. 2012). Los estudios observacionales sugieren que los CDi podrían estar asociados con un aumento en el riesgo de diabetes/mal control de la diabetes, cataratas e infección por micobacterias, incluyendo la tuberculosis (Barnes 2010).

En cuanto a la suspensión de los CDi en la EPOC, los estudios proveen de resultados equívocos en cuanto a las consecuencias de la suspensión sobre la función pulmonar, síntomas y exacerbaciones probablemente por las diferencias en cuanto a metodología de dichos estudios (Van der Valk y col. 2002, Wouters y col. 2005, Magnussen y col. 2014, Kunz y col. 2015).

En referencia al escalamiento a la triterapia (LABA, LAMA y CDi), esta pueden mejorar la función pulmonar y los desenlaces reportados por los pacientes, particularmente en el riesgo de exacerbación (Singh y col. 2008, Welte y col. 2009, Jung y col. 2012, Hanania y col. 2012), aunque hay algún estudio que no ha encontrado beneficios con la triple terapia (Aaron y col. 2007) pero, en

general, se necesitan más evidencias para llegar a conclusiones firmes sobre los beneficios de la triterapia comparado con la terapia dual LAMA/LABA.

En relación al Roflumilast inhibe la reacción inflamatoria asociada con la EPOC mediante la inhibición de la enzima fosfodiesterasa 4 (PDE4) y por el aumento intracelular adenosina monofosfato cíclico (cAMP). Roflumilast se administra por vía oral en forma de una tableta al día. No es un broncodilatador y no se puede usar para mejorar la obstrucción bronquial aguda, aunque durante el tratamiento a largo plazo en pacientes que ya están en tratamiento con salmeterol o tiotropio, el Roflumilast aumenta aún más el VEF₁ en 50-80 ml. Este fármaco reduce las exacerbaciones de la EPOC y mejora la función pulmonar, pero también tiene importantes efectos adversos. El Roflumilast reduce las exacerbaciones moderadas (que requieren glucocorticoides sistémicos) y severas (que conducen a la hospitalización o la muerte) en pacientes con EPOC que tienen EPOC severa (VEF₁ <50% predicho), bronquitis crónica y exacerbaciones frecuentes a pesar de los broncodilatadores de acción prolongada. En contraste, los efectos sobre la calidad de vida y los síntomas son menos pronunciados (Kankaanranta y col. 2015).

El tratamiento farmacológico de EPOC en función del fenotipo se muestra resumido en la siguiente tabla (no se incluye el tratamiento antibiótico):

FENOTIPO	
Bajo riesgo de exacerbación	<ul style="list-style-type: none"> ● Menos síntomas (CAT <10): <ul style="list-style-type: none"> ▸ SABA y/o SAMA ● Más síntomas (CAT >10): <ul style="list-style-type: none"> ▸ Diariamente LABA y/o LAMA ▸ Considerar un diagnóstico alternativo (especialmente enfermedad cardíaca) ▸ Teofilina
Alto riesgo de exacerbación	<ul style="list-style-type: none"> ● Elegir una de las alternativas posibles considerando los riesgo y beneficios individualmente: <ul style="list-style-type: none"> ▸ LAMA ▸ CDi +LABA ▸ LAMA+LABA ▸ Roflumilast (si hay frecuentes exacerbaciones, bronquitis crónica y VEF₁ <50%)
ASMA-EPOC (ACOS)	En la combinación de ambas enfermedades, generalmente el tratamiento ha de incluir al menos: CDi +LABA o CDi+LABA+LAMA

Tabla 4 : Terapia fenotípica específica de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Kankaanranta y col. 2015

LAMA: anticolinérgico de larga duración; CDi: glucocorticoides inhalados LABA: beta-2 agonista de larga duración.

La guía GOLD 2017 le da mucha importancia a la educación y al entrenamiento de la técnica inhalatoria. Los estudios randomizados y controlados no han identificado superioridad de un dispositivo/formulación sobre otro (Rootmensen y col. 2010). Sin embargo, los pacientes incluidos en esos estudios son usualmente aquellos que saben las técnicas inhalatorias y que reciben una educación apropiada y son reentrenados, por lo que podrían no reflejar la vida real.

Los estudios observacionales han mostrado que, aunque el tipo y frecuencia de los errores en la inhalación varían entre los diferentes dispositivos (Sulaiman y col. 2016), sin embargo, no existe ningún dispositivo que no necesite explicación y demostración de su uso y revisión regular de la técnica inhalatoria.

Por otro lado, la Guía GOLD 2017, hace referencia al tratamiento con oxígeno como terapia suplementaria. Éste ha demostrado que podría mejorar la supervivencia de los pacientes con EPOC. Especialmente, aquellos que se ven más beneficiados son los que presentan hipoxemia en reposo. Para lograr un efecto adecuado se debe emplear al menos 15 h al día (durante la noche y completar el tiempo restante durante el día). Está indicado cuando el sujeto presenta una presión parcial de oxígeno <55 mm Hg o saturación de oxígeno (SaO_2) $<88\%$, con o sin hipercapnia, confirmado en dos ocasiones en un lapso de tres semanas, o en individuos con presión parcial de oxígeno de 55 a 60 mm Hg o SaO_2 de 88% , si existe evidencia de hipertensión pulmonar, corazón pulmonar, edema periférico o policitemia. También, el oxígeno suplementario puede administrarse de forma titulada a nivel intrahospitalario, en las exacerbaciones, ya que puede mejorar la hipoxemia del paciente con una saturación 88-92% (Austin y col 2010). Sin embargo, una vez que se ha iniciado el tratamiento con oxígeno, los gases en sangre deberían de revisarse con frecuencia para asegurar una oxigenación satisfactoria sin retención de dióxido de carbono y / o empeoramiento de la acidosis.

Esta guía también resalta muy especialmente, el automanejo. Lo define como una intervención estructurada pero personalizada y, a menudo, multicomponente, con objetivos de motivación y apoyo a los pacientes para que se adapten positivamente a sus hábitos saludables y desarrollen destrezas para manejar mejor su enfermedad. El proceso requiere interacciones entre el paciente y el profesional de salud. Se utilizan técnicas de cambio de hábitos para motivar a los pacientes, darles confianza y competencias. Diversos estudios y revisiones sistemáticas han proveído de evidencias que las intervenciones de automanejo mejoran los resultados en la EPOC (Sanchez y col. 2016, Zwerink y col. 2014). Una revisión *Cochrane* reportó que una de estas intervenciones que incluía planes de acciones negociados escritos frente al empeoramiento de los síntomas, llevó a una menor probabilidad de hospitalizaciones (Turnock y col. 2001).

Existen aún problemas en cuanto a la heterogeneidad de las intervenciones, entre otros aspectos, como para formular recomendaciones claras en cuanto a la forma más efectiva y los contenidos de estas intervenciones en la EPOC.

➤ 1.4.3.1. ANTIBIÓTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS EXACERBACIONES DE EPOC

La utilización de antibióticos en las exacerbaciones de la EPOC sigue siendo una parte importante del manejo en la práctica clínica de estos pacientes, a pesar de la sobreestimación de las bacterias en muchos de los estudios y de la aparición de nuevos estudios que implican también a los virus como agentes etiológicos de estas infecciones. Los estudios más recientes ya con un diseño y una metodología mejorada estiman que sólo el 50% de las exacerbaciones tienen una etiología bacteriana (Sethi y Murphy 2008). Al menos un tercio de los casos están causados por virus, en los que están incluidos *influenza*, *parainfluenza*, virus respiratorio sincitial, *virus de metapneumoniae* humana, *picomavirus*, y *coronavirus* (Sethi y Murphy 2008, Rohde y col. 2003). El resto de las causas de exacerbaciones agudas en la EPOC pueden ser debidas a la contaminación, a cambios en la calidad del aire, combustibles de biomasa, insuficiencia cardíaca, embolismo pulmonar y neumotórax entre otras.

Por otro lado, las guías de EPOC (GOLD 2017) recomiendan el tratamiento empírico antibiótico en ciertas poblaciones de pacientes, particularmente en pacientes con exacerbaciones moderadas a severas. Esta última recomendación está basada en los criterios de Anthonisen, que se caracteriza por aumento de la purulencia del esputo y por al menos uno de los siguientes aspectos: incremento de la disnea y del volumen de esputo. El empleo de esta clasificación para iniciar el tratamiento en pacientes con exacerbaciones moderadas a graves se basa en gran medida en una revisión sistemática por Ram y col. (2006). En esta revisión los antibióticos mostraron una disminución en la mortalidad a corto plazo en un 77%, un fracaso del tratamiento en un 53% y una purulencia del esputo en un 44%. La producción de esputo purulento *versus* mucoide es indicativo de pacientes que se beneficiarían de los antibióticos según lo determinado por Stockley y col. (2000). En su estudio, el esputo purulento dió como resultado cultivos bacterianos positivos en el 84% de los pacientes, comparado con el 38% de los que produjeron esputo mucoide ($p < 0,0001$). Se encontró que el esputo purulento era en un 94,4% sensible y en un 77% específico, en cuanto a la asociación de este con una alta carga bacteriana. Al evaluar la resolución clínica, todos los pacientes con esputo mucoide mejoraron sin tratamiento antibiótico. La utilización de la purulencia del esputo

como piedra angular en la decisión de iniciar tratamiento antibiótico no es del todo fiable. Los pacientes no pueden evaluar rutinariamente el esputo expectorado, y la apariencia puede cambiar rápidamente. En un estudio de Daniels y col. (2010), los colores de esputo reportados por los pacientes se compararon con los evaluados usando una tabla de colores validados como marcadores para la carga bacteriana y la inflamación sistémica. La sensibilidad y especificidad para el color del esputo reportado fue de 73% y 39% respectivamente, en comparación con el 90% y 52% en el esputo evaluado, lo que indicaría que el color reportado por el paciente no era fiable.

Los biomarcadores pueden ser de utilidad como un medio para determinar la etiología de las exacerbaciones de la EPOC, además de desempeñar un papel en el diagnóstico y la evaluación de la gravedad (Lacoma y col. 2009). Recientemente, el Consorcio de Cualificación de Biomarcadores de la EPOC recibió aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos para utilizar el fibrinógeno plasmático como biomarcador de EPOC (Miller y col. 2016). En relación con los biomarcadores relacionados con la infección, la procalcitonina se utiliza como marcador de la sepsis por bacterias. Como es un indicador de infección bacteriana sistémica, por lo tanto, puede emplearse para identificar las exacerbaciones causadas por tales patógenos y para determinar si se deben administrar antibióticos. Esto fue evaluado por Stolz y col. (2007), quienes asignaron al azar pacientes a grupos de tratamiento estándar o tratados con procalcitonina. Se desalentó el uso de antibióticos en pacientes con niveles de procalcitonina de hasta 0,1 µg/ L. Los niveles entre 0,1 y 0,25 µg/ L indicaron una posible infección bacteriana y el tratamiento con antibióticos se basó en la condición clínica. En pacientes con niveles de procalcitonina superiores a 0,25 µg/L, el uso de antibióticos fue fuertemente apoyado. El estudio no indicó diferencias en cuanto al éxito clínico, a pesar de la disminución del uso de antibióticos en pacientes con bajos niveles de procalcitonina. Además, cuando los pacientes fueron evaluados a los seis meses, no hubo diferencias estadísticamente significativas en las tasas de exacerbación, las tasas de re-hospitalización y el tiempo hasta la próxima exacerbación. La procalcitonina también se ha estudiado para evaluar la respuesta al tratamiento. En una revisión sistemática de 14 ensayos, Schuetz y col. (2012) evaluaron el efecto del uso de un algoritmo de procalcitonina para guiar el inicio y la interrupción de los antibióticos en las infecciones agudas del tracto respiratorio. En este análisis, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el fracaso del tratamiento o mortalidad a los 30 días cuando se usó procalcitonina para guiar la iniciación y duración del tratamiento antibiótico. Además, la duración media de la exposición a antibióticos fue un 34,8% menor en el grupo de procalcitonina en comparación con el grupo de tratamiento estándar (intervalo de confianza del 95% [IC], -40,3 a -28,7).

En otro sentido una vez se inician antibióticos en pacientes con exacerbaciones de la EPOC, el régimen de tratamiento debe basarse en la gravedad, en los patógenos probables y en los patrones de sensibilidad local. Por ello, la terapia es generalmente empírica. Las bacterias patógenas más comunes son: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Aunque los patógenos atípicos poco frecuentes, incluyendo *Chlamydophila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*, también pueden ser causas infecciosas de exacerbaciones (Dixit y col. 2016). Los pacientes moderadamente graves pueden dividirse en pacientes sin complicaciones y exacerbaciones complicadas basadas en ciertos parámetros para ayudar a guiar la terapia. Generalmente, los pacientes con exacerbaciones no complicadas son aquellos menores de 65 años de edad con VEF₁ más del 50% del pronosticado que experimentan menos de tres exacerbaciones por año (Sethi y Murphy 2008, Sykes y col. 2007). Estos pacientes pueden ser tratados con los macrólidos más nuevos, o con una cefalosporina de segunda o tercera generación. Durante mucho tiempo la amoxicilina ha sido considerada como una opción para la terapia de primera línea, pero ya no debería de usarse debido al aumento de la producción de beta-lactamasas por parte *H. influenzae* y *M. catarrhalis*, salvo que se utilice la combinación con un inhibidor de las betalactamasas, siendo la más utilizada amoxicilina con clavulánico, ya que éste inhibe el efecto hidrolítico de las betalactamasas que lo harían resistente al antibiótico por si solo, que como se ha expuesto con anterioridad, es un preocupación en los pacientes con exacerbación aguda. Si bien, hay que tener en cuenta que algunos microorganismos como *H. influenzae* pueden producir una gran cantidad de estas enzimas e incluso serían resistentes a amoxicilina/clavulánico. De manera similar, han aumentado las resistencias a la doxiciclina y trimetoprim/sulfametoxazol, por lo que estos fármacos tampoco deberían incluirse como primera línea de tratamiento (Sponser y col. 2012). Las exacerbaciones complicadas deben de tratarse con una fluoroquinolona con acción a nivel respiratorio o amoxicilina/clavulánico (Sethi y Murphy 2008, Sykes y col. 2007).

Entre el uso de estos diversos antibióticos, la literatura no apoya firmemente la utilización de un antibiótico sobre otro. En el estudio de Wilson y col. (2012), se comparó moxifloxacino administrado durante nueve días con amoxicilina/clavulánico administrado durante siete días. El fracaso clínico a las ocho semanas posteriores a la terapia fue de 20,6% y 22% (IC del 95%, -5,89 a 3,83) para el moxifloxacino y amoxicilina/clavulánico, respectivamente, lo que indica indiferencia en cuanto a la eficacia entre ambos dos. De manera similar, en un estudio realizado por Yoon y col. (2013), el levofloxacino se comparó con cefuroxima en las exacerbaciones agudas de EPOC, estratificado por gravedad. En este estudio se determinó que la eficacia clínica era comparable entre

los dos antibióticos (90,4%) en el grupo de levofloxacino comparado con el 90,6% en el grupo de cefuroxima (IC del 95%, -9,40 a 10,91).

En la agudización moderada o grave estará indicado el tratamiento antibiótico, cuando en ausencia de purulencia, haya incremento de la disnea y del volumen de esputo. En las agudizaciones muy graves, cuando el paciente requiere asistencia ventilatoria, la cobertura antibiótica es obligada, ya que ha demostrado reducir la incidencia de neumonía secundaria y disminuir de forma secundaria la mortalidad. Este aspecto fue demostrado por Nouria y col. (2001), que realizó un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego, cebo-controlado que se llevó a cabo en 93 pacientes con exacerbaciones agudas ingresados en la UCI que requerían ventilación mecánica (invasiva y no invasiva), concluyendo que las fluoroquinolonas (ofloxacino 400 mg) de amplio espectro son útiles para tratar las exacerbaciones agudas de EPOC especialmente en aquellos pacientes sometidos a ventilación mecánica, sobretodo porque reduce el riesgo de mortalidad hospitalaria y el fracaso al tratamiento, este último también coincide con el estudio de Quon y col. (2008). Aunque también Nouria y col., resaltó que su uso frecuente aumentaba las resistencias a estos antibióticos. Con lo cual las fluoroquinolonas de amplio espectro deberían estar reservadas solo para episodios severos de infección cuando haya alta sospecha de *Paeruginosa*. En este mismo sentido, la revisión sistemática (Vollenweider y col. 2012) indica que para pacientes ingresados en cuidados intensivos, el uso de antibióticos produce beneficios importantes y consistentes. Sin embargo, en pacientes hospitalizados fuera de cuidados intensivos y ambulatorios los resultados son más inconsistentes y no se han demostrado efectos estadísticamente significativos ni sobre la mortalidad ni sobre la duración de la estancia hospitalaria. Probablemente, los resultados no son consistentes porque se incluyeron pacientes muy diversos, de tal forma que los autores recomiendan la investigación de algunos signos clínicos o de determinados biomarcadores para identificar los casos que se beneficiarán de antibióticos.

En los pacientes con exacerbaciones severas o en los pacientes con uso frecuente de antibióticos o de una hospitalización reciente, además se debe considerar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos Gram negativos, particularmente si estos patógenos han sido previamente aislados (Sponsler y col. 2012). En este subconjunto de pacientes, dependiendo de la sensibilidad antibiótica local, el ciprofloxacino, el levofloxacino, la piperilina/tazobactam, la ceftazidima o la cefepima deben iniciarse empíricamente y se deben obtener cultivos de esputo (Sykes y col. 2007, Sponsler y col. 2012). Los pacientes con una exposición reciente a antibióticos deben iniciarse con un antibiótico de clase diferente para el tratamiento de la exacerbación (Sponsler y col. 2012).

Una vez que se haya elegido antibiótico en función del paciente, el tratamiento debe iniciarse de la manera más oportuna, ya que los antibióticos se han asociado con un aumento en el tiempo libre de exacerbaciones. En el estudio realizado por Roede y col. (2008), 49.599 pacientes holandeses, que recibieron antibióticos para la primera o segunda exacerbación tuvieron un tiempo medianamente más largo para las exacerbaciones posteriores en 97 y 113 días, respectivamente ($P < 0,001$). Además, la administración temprana de antibióticos se ha asociado con mejores resultados en los pacientes hospitalizados. En un estudio observacional de 84.621 pacientes realizado por Rothberg y col. (2010) se identificó una disminución del fracaso del tratamiento, de la mortalidad hospitalaria y de la ventilación mecánica tardía, en los pacientes que comenzaron a tomar antibióticos en el día 2 de la hospitalización. Independientemente del régimen empírico y la gravedad de la exacerbación, los pacientes deben ser reevaluados entre las primeras 48 a 72 horas tras el ingreso. Si el paciente muestra signos de mejoría clínica, puede ocurrir que se produzca una conversión a la terapia oral o el régimen puede ser reemplazado en función de los resultados del cultivo de esputo y los resultados de sensibilidad antibiótica (Siddiqui y Sethi 2008). En cuanto a la duración del tratamiento puede variar de 5 a 7 días según GOLD 2017. Un meta-análisis realizado por Moussaoui y col. (2008) estableció que la terapia de corta duración (< 5 días) fue tan eficaz, en cuanto a la curación clínica, como la duración convencional (7-10) para pacientes con exacerbaciones agudas de EPOC pero en los pacientes de leves a moderados. Se desconoce si estos datos se pueden extrapolar o bien pueden ser extrapolados para pacientes de la UCI, los cuales sufren de una enfermedad más severa. La duración del tratamiento debe seguir evaluándose para la mejora de los signos clínicos (por ej., disnea).

➤ 1.4.3.2. ANTIBIÓTICOS PARA PREVENIR EXACERBACIONES DE EPOC

La terapia antimicrobiana y, específicamente, el uso a largo plazo de antibióticos macrólidos ha obtenido una atención significativa como estrategia para prevenir las exacerbaciones de EPOC. Las preocupaciones por el aumento de las resistencias a los macrólidos y el uso excesivo de antimicrobianos en esta población deben tenerse muy en consideración y más especialmente ha de tenerse en cuenta las posibles implicaciones clínicas en cuanto a su uso diario para reducir la frecuencia de las exacerbaciones.

En el estudio Albert y col. (2011), doble ciego y controlado con placebo, 92 pacientes adultos con EPOC que tuvieron ≥ 3 exacerbaciones en el año anterior fueron asignados aleatoriamente para recibir azitromicina 500 mg (47 pacientes) o placebo (45 pacientes) tres veces /

semana durante 12 meses. El criterio de valoración primario fue la tasa de exacerbaciones de EPOC que se produjeron durante el año de tratamiento. Se registraron un total de 84 exacerbaciones en pacientes que recibieron azitromicina en comparación con 129 exacerbaciones en el grupo placebo. La tasa de exacerbación no ajustada fue de 1,94 paciente/año (IC del 95%: 1,50-2,52) para el azitromicina y 3,22 / paciente/año (IC del 95%: 2,62-3,97) para el placebo. Por lo tanto, la azitromicina se asoció con una reducción significativa en las tasas de exacerbación en comparación con el placebo (0,58; IC del 95%: 0,42-0,79; $p = 0,001$), lo que indica que la azitromicina, cuando se utiliza en pacientes con alto riesgo de recidiva de la enfermedad subyacente o que son refractarios a la atención estándar, pueden disminuir la exacerbación y la morbilidad asociada con la enfermedad. Es importante destacar que los pacientes que recibían una terapia óptima para el tratamiento de EPOC, incluyendo un corticosteroide inhalado, un beta-agonista de acción prolongada y el anticolinérgico de acción prolongada, no tuvieron un beneficio significativo con la adición de azitromicina. Los pacientes con EPOC de etapa II y aquellos que no recibieron un régimen de triple fármaco tuvieron más probabilidades de beneficiarse de la adición de azitromicina de acuerdo con este estudio, destacando así la importancia de optimizar el régimen de tratamiento a fondo antes de iniciar el tratamiento crónico con azitromicina para reducir los riesgos asociados con resistencia antimicrobiana y efectos adversos.

Similares resultados se obtuvieron en el estudio Uzun y col. (2014), que es un ensayo aleatorio, doble-ciego, placebo-controlado, 92 pacientes adultos con EPOC que habían tenido ≥ 3 exacerbaciones en el año anterior, fueron asignadas aleatoriamente para recibir o bien azitromicina 500 mg (47 pacientes) o bien placebo (45 pacientes), tres veces/semana durante 12 meses. Se registraron un total de 84 exacerbaciones en pacientes que recibieron azitromicina comparado con 129 exacerbaciones en el placebo. Concluyendo que la azitromicina, cuando se utiliza en pacientes de alto riesgo para la recurrencia de exacerbación de la enfermedad subyacente o que son refractarios a la atención estándar, puede disminuir la exacerbación y la morbilidad asociadas con la enfermedad.

En el resto de los estudios revisados (Seemungal y col. 2008, Blasi y col. 2010, He y col, Suzuki y col. 2010, Simpson y col. 2014) en general sugirieron beneficios sustanciales de utilizar los macrólidos como profilácticos, pero merece la pena señalar que en uno de los estudios revisados, los hallazgos eran altamente inconsistentes con respecto al resto. Banerjee y col. (2005) fue el único estudio en el que los macrólidos no previenen las exacerbaciones de la EPOC. Esto podría ser debido a la duración limitada del estudio y al pequeño número de exacerbaciones totales observadas, limitando así el poder del estudio para detectar un verdadero efecto. Cabe destacar que,

además de los cinco estudios que sugieren un beneficio significativo para los macrólidos, dos estudios de cohortes adicionales mostraron una reducción estadísticamente significativa de las exacerbaciones de la EPOC entre los pacientes que tomaron macrólidos profilácticos. Yamaya y col. (2008) examinaron retrospectivamente los registros hospitalarios de 131 pacientes y determinaron una reducción del riesgo relativo del 19% (RR 0,81; IC del 95%: 0,69e^{0,95}) en las exacerbaciones de la EPOC entre los pacientes que tomaban macrólidos profilácticos. Además, Gómez y col. (2000) monitorizaron prospectivamente pacientes que recibieron 500 mg de azitromicina por día durante tres días cada 21 días y encontraron que los macrólidos reducían el riesgo de exacerbaciones de la EPOC en un 45% (RR 0,55; IC del 95%: 0,46 e^{0,68}).

Por tanto, la evidencia “*in vivo*” y “*in vitro*” de diversos estudios y de la investigación multicéntrica a gran escala confirman los efectos antiinflamatorios únicos y clínicos del uso de macrólidos para el mantenimiento en cuanto al tratamiento de la EPOC. Sin embargo, el mecanismo de cómo los macrólidos previenen las exacerbaciones de la EPOC no se entiende completamente y todavía hay que determinar qué subgrupos de EPOC podrían obtener un mayor beneficio del uso de esta terapia. Además, en comparación con el amplio uso de beta-agonistas y agentes antimuscarínicos de acción prolongada con o sin corticosteroides inhalados, aún no se ha logrado un consenso sobre el uso a largo plazo de macrólidos para pacientes con EPOC (Qiu y Zong 2016).

Por otra parte, y en cuanto a, la utilización de quinolonas durante los periodos de estabilidad (tratamiento de la infección bronquial crónica) han demostrado erradicar las bacterias presentes en el esputo en la mayoría de pacientes con EPOC grave y agudizaciones frecuentes. En el ensayo clínico PULSE (*Pulsed moxifloxacin Usage and its Long terms impact on the reduction of Subsequent Exacerbation*) de Sethi y col. (2010), se evaluó la eficacia de la administración cíclica de moxifloxacino (400 mg/día, 5 días cada 2 meses) durante un año en pacientes con EPOC estable. Los resultados demostraron que el tratamiento redujo de forma significativa un 45% las agudizaciones en los pacientes que presentaban esputo purulento o mucopurulento, es decir, con mayor probabilidad de presentar una infección bronquial bacteriana crónica. En este estudio no se observó un incremento significativo de las resistencias.

Sin embargo, la prevención de la infección aguda y crónica en la EPOC se lograría mejor mediante la modulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas con vacunas y nuevos fármacos. Hasta que esto sea posible, el tratamiento con moxifloxacino pulsado intermitente podría estar indicado en ciertos subgrupos de pacientes. Estos pacientes incluyen aquellos con producción de esputo purulento / mucopurulento o purulento basal, que no son colonizados por *P. aeruginosa* y

que tienen una frecuencia inaceptable de exacerbaciones a pesar de la terapia máxima con agentes inhalados para EPOC o que experimentan complicaciones tales como neumonía. Aunque PULSE demuestra que el tratamiento intermitente con moxifloxacino es una opción eficaz para prevenir las exacerbaciones agudas en pacientes con EPOC, se requieren más estudios para determinar la población óptima de pacientes, así como el régimen de dosificación y la duración de la terapia para este abordaje (Sethi y col. 2010).

➤ 1.4.3.3. VACUNAS

En la población general, se ha observado que la vacunación de personas mayores de 65 años contra la *influenza* reduce la neumonía, la hospitalización y las muertes en un 50-68%. La mayoría de los pacientes con EPOC pertenecen a este grupo de edad. La vacunación contra la *influenza* reduce las exacerbaciones de la EPOC. Se recomienda la vacunación anual contra la gripe para todos los pacientes con EPOC (Kankaanranta y col. 2015).

Las vacunas neumocócicas, PCV13 y PPSV23, se recomiendan para todos los pacientes \geq 65 años de edad. Se ha demostrado que el PPSV23 reduce la incidencia de neumonía adquirida en la comunidad en pacientes con EPOC <65 años, con un VEF₁ <40% previsto, o comorbilidades (especialmente comorbilidades cardíacas) (iniciativa GOLD 2017).

➤ 2. MICROBIOMA DEL PULMÓN

➤ 2.1. CONCEPTOS INICIALES

En la siguiente tabla, se muestra el glosario de términos utilizados en el microbioma en pacientes con EPOC:

TÉRMINOS	
○	MICROBIOMA: es el conjunto de microorganismos y sus correspondientes genes que están albergados por la microbiota, así como el medio en el que interactúan
○	NUEVAS TECNOLOGÍAS DE SECUENCIACIÓN: son tecnologías de alto rendimiento, que permiten una secuenciación rápida del ADN en paralelo como son, <i>Roche 454 Pyrosequencing</i> , <i>Illumina HiSeq</i> , <i>Illumina MiSeq</i> .
○	PIROSECUENCIACIÓN: es una tecnología que permite determinar una secuencia de ADN a gran escala, aplicable a genomas completos, mediante reacciones enzimáticas de luminiscencia. El método se basa en la detección luminométrica de pirofosfato que es liberado una vez que se incorpora un nucleótido, con señales de luz proporcionales al número de nucleótidos incorporados en serie.
○	METAGENOMA: La información genética de toda la microbiota, usualmente obtenida por secuenciación del genoma completo. Este es el potencial genético funcional proporcionado por los genomas de muchos organismos individuales.
○	GEN 16S ARNr: Gen que codifica una subunidad 16S de ribosomas bacterianos altamente conservado entre diferentes especies bacterianas y que es específico y único de las células procariotas
○	SECUENCIACIÓN DEL GEN rARN: es la determinación de la secuencia de ADN de un gen ribosómico 16S, particularmente las regiones que son variables entre las especies
○	TAXONOMIA: ciencia que se encarga de la clasificación e identificación de especies
○	UNIDAD OPERACIONAL TAXONÓMICA: definida como la categorización de organismos en especies o grupos de especies basada en la similitud de secuencias específicas de ADN.
○	FILOGENÉTICA: El estudio de la historia evolutiva de un organismo entre diferentes grupos de organismos a partir de la distribución de los caracteres primitivos y derivados en cada taxón, utilizando matrices de información de moléculas de ADN y de morfología.
○	BIOINFORMÁTICA: Campo multidisciplinario relativo al estudio, desarrollo y uso de herramientas para analizar datos biológicos
○	RIQUEZA: El número de unidades taxonómicas únicas detectadas en una muestra
○	ALFA-DIVERSIDAD: Una medida de la riqueza y uniformidad dentro de una muestra (índice Shanon)
○	BETA-DIVERSIDAD: Representa la similitud de la composición bacteriana entre muestras (Brays-Curtis o UniFrac).
○	MICROBIOTA: Todos los microbios que se encuentran en una región o hábitat en particular (el término "microflora" ya no se utiliza)

Tabla 5: Glosario de términos más utilizados en el presente estudio.

Adaptado: Dickson y col. 2014; Segal y col. 2014; Mammen y Sethi 2015.

➤ 2.2. MÉTODOS USADOS EN EL ANÁLISIS DEL MICROBIOMA DE PULMÓN

Durante mucho tiempo las vías respiratorias bajas se han considerado estériles, dado que tradicionalmente se habían aplicado métodos convencionales basados únicamente en el cultivo (caracterización fenotípica que estudia rasgos morfológicos, metabólicos, fisiológicos y químicos de la célula). La mayoría de métodos de asignación taxonómica requieren no sólo que la bacteria sea cultivable sino que seamos capaces de aislarla, lo cual restringe enormemente el número de bacterias a estudiar por estos métodos convencionales. De hecho, somos incapaces de cultivar la mayoría de especies bacterianas y, según las últimas estimaciones, solamente en 8 de los 28 filos bacterianos conocidos hay especies cultivables en la actualidad (Achtman y Warner 2008). Uno de los argumentos que explican nuestra incapacidad para cultivar la mayoría de las bacterias es que no disponemos de información suficiente para el desarrollo de medios de cultivo, y a que no conocemos todas las concentraciones y proporciones de oligoelementos y sustratos requeridos, aunque, de hecho, poco a poco se están haciendo más avances en esta dirección (Kaeberlein y col. 2002; Stevenson y col. 2004), incluidos nuevos métodos de cultivo para bacterias del microbioma humano (Tian y col. 2010). Otras especies bacterianas son capaces de entrar en un estado viable no cultivable o inactivo y, a pesar de tener las condiciones óptimas para crecer, necesitan una señal para activarse. Algunas de estas señales pueden ser moléculas involucradas en *quorum sensing* y transducción de señales, como el AMP cíclico y las acil-homoserina-lactonas (Bruns y col. 2002, Zengler 2009).

Además de las limitaciones que supone el cultivo, otro aspecto que ha apoyado aún más la noción de esterilidad de las vías respiratorias bajas es que, los pulmones han desarrollado multitud de mecanismos de defensa para limitar la residencia y crecimiento de bacterias (sistema mucociliar y sistema inmune) (Sze y col. 2014).

Por tanto, como ya se ha mencionado anteriormente, el concepto de esterilidad de las vías respiratorias bajas se validó por métodos como el cultivo, pero estos métodos fallan a la hora de permitir el crecimiento de determinados microorganismos que se encuentran, de forma normal, en el tejido pulmonar. Sin embargo, el uso de técnicas moleculares modernas demuestra la existencia de bacterias en las vías respiratorias inferiores. Dichas técnicas, permiten el estudio del microbioma del pulmón, a pesar de que este hecho se encuentra en las primeras etapas de investigación. Es más, existe un conjunto de evidencias ya publicadas, que demuestran que filogenéticamente existe una gran diversidad de comunidades microbicas en los pulmones de individuos sanos, y que se pueden detectar mediante la secuenciación del microorganismo. Mientras los resultados publicados en los

diferentes estudios difieren en cuanto a la microbiota encontrada, los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son los que se han aislado con mayor frecuencia a este nivel. A nivel de género predominan, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria* y *Veillonella*, y con menor frecuencia los géneros potencialmente patógenos, *Neisseria* y *Haemophilus* (Beck y col. 2012).

El análisis de la composición bacteriana independiente del cultivo se ha basado hasta ahora en el gen que codifica el ARN ribosómico (16S ARNr). El ribosoma es esencial para la transcripción del ARN mensajero y, en las bacterias, el gen 16S ARNr se ha mantenido inalterado a lo largo de los siglos, ya que cualquier mutación limita su viabilidad. El análisis del gen 16S ARNr permite así la clasificación taxonómica de cada estirpe bacteriana y su secuenciación es utilizada para describir la composición de las bacterias presentes en un ecosistema. Las bases de datos de referencia del gen 16S ARNr permiten clasificar las secuencias en una muestra desde los niveles taxonómicos más altos (filo) hasta los inferiores (género), aunque en ocasiones se pueden mostrar insuficientes para alcanzar el nivel de especie (Monsó, 2016). Muchas técnicas moleculares modernas para la identificación bacteriana utilizan la variación en el gen del 16S ARNr. Hay nueve regiones hipervariables de ARN del ribosoma 16S o el gen de 16S ARNr, que está marcado V1 a V9, y las regiones V1-V3 son más comúnmente usadas para secuenciar muestras de microbioma humano (secuenciación de genes 16S ARNr) (Figura 5). A pesar de que ninguna región puede diferenciar entre todas las bacterias, la región V1-V3 distingue casi todas las bacterias consideradas patógenas en el nivel de género, excepto para *Enterobacteriaceae* (Mammen y Sethi 2016).

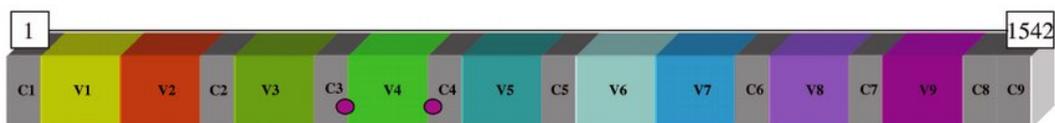


Figura 5: Representación del gen 16S ARNr con sus regiones variables (v) y conservadas (c).

La secuenciación de alto rendimiento de los amplicones del gen rRNA 16S generados a partir de muestras biológicas que contienen bacterias produce un gran número de secuencias cortas que pueden alinearse y clasificarse posteriormente de acuerdo con un nivel predefinido de homología. Estas se clasifican de acuerdo a las bases de datos taxonómicamente disponibles [RDP, *Greengenes*, BLAST] (Liu y col. 2008). La identificación bacteriana se aborda utilizando el término de «unidad taxonómica funcional» (*operational taxonomic unit* [OTU]) y considerando como tal cada unidad taxonómica similar a la de referencia. Así, una OTU se estimará como equivalente a género si su coincidencia con la referencia alcanza un 94%, o a especie, cuando llega al 97%. La composición del microbioma se expresa habitualmente como abundancia relativa, entendiendo como tal la proporción de copias del gen 16S ARNr que corresponden a cada OTU identificada. La limitación más importante del uso del análisis del gen 16S ARNr es la imposibilidad de obtener información de virus y hongos por esta vía (Monsó, 2016). Así, utilizando estos principios, plataformas como la pirosecuenciación 454 y la secuenciación *Illumina* permiten la identificación y cuantificación de comunidades microbianas enteras en múltiples muestras de tejido simultáneamente. Estas técnicas sensibles y rápidas, a menudo más completas y precisas que los métodos tradicionales dependientes del cultivo, han mejorado drásticamente su eficiencia y han disminuido sus costes en la última década (Dickson y col. 2014).

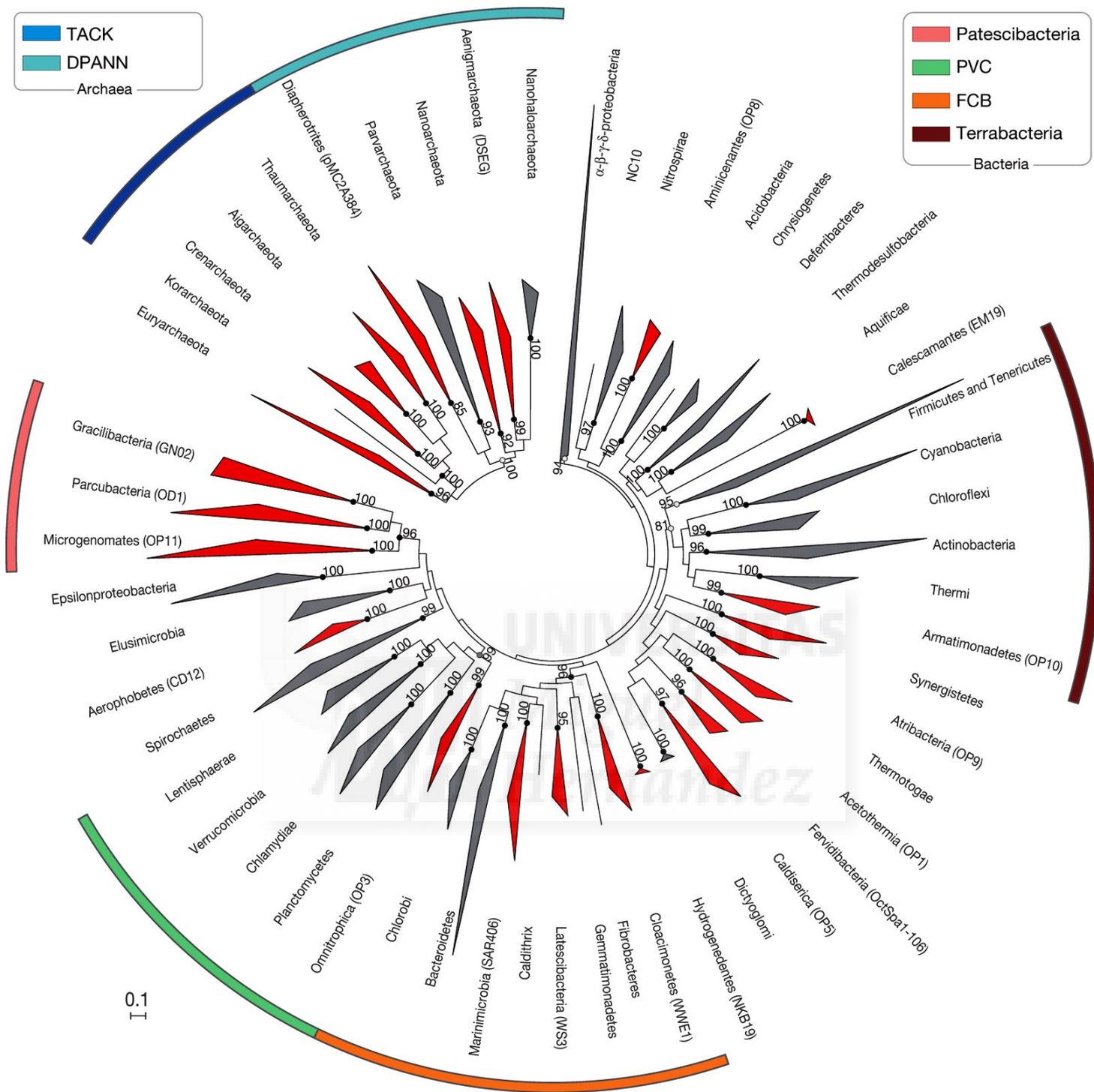


Figura 6: Inferencia filogenética de probabilidad máxima de *Archaea* y *Bacteria*. Obsérvese especialmente los filos incluidos en el dominio *Bacteria*. Rinke y col., 2013.

➤ 2.3. MICROBIOMA DEL PULMÓN EN PACIENTES SANOS Y DETERMINANTES DEL MICROBIOMA

Numerosos estudios publicados han caracterizado el microbioma pulmonar de sujetos adultos sanos utilizando muestras de LBA (Erb-Downward y col. 2010, Charlson y col. 2012, Charlson y col. 2011, Hilty y col. 2010, Pragman y col. 2012, Sze y col. 2012, Huang y Lynch 2011). El sujeto normal aloja una flora microbiana filogenéticamente diversa en el árbol broncopulmonar con *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* como sus filos más frecuentes, y una frecuencia baja de OTU correspondientes a microorganismos potencialmente patógenos como los del género *Haemophilus* (Charlson y col. 2011). Los filos descritos en las muestras de LBA son similares a los observados en las muestras de vía aérea superior (orofaringe, nasal) recogidas ambas dos de forma simultánea, pero difieren en la abundancia relativa (por ejemplo, frecuencia relativa de *Actinobacteria*). Los géneros predominantes entre los controles sanos son *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus* y *Pseudomonas*. Otros estudios recientes que han recogido muestras de la orofaringe y de lavado broncoalveolar por procedimientos distintos, y especialmente, dirigidos a imposibilitar la contaminación cruzada de las muestras, y realizados en el mismo día, han confirmado la similitud entre el microbioma de la orofaringe y el árbol broncopulmonar en el sujeto sano, paralelismo que se ha atribuido a la aspiración de secreciones durante el sueño (Dickson y col. 2015, Bassis y col. 2015).

Filos	Géneros
BACTEROIDETES	<i>Prevotella</i> <i>Bacteroides</i>
FIRMICUTES	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Veillonella</i>
PROTEOBACTERIA	<i>Pseudomonas</i> <i>Haemophilus</i> <i>Moraxella</i> <i>Neisseria</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Escherichia</i>

Tabla 6: Taxonomía de los filos y los géneros más descritos en los estudios del microbioma del pulmón humano. Adaptado Dickson y col. 2014.

En cuanto a los determinantes primarios en la constitución del microbioma pulmonar de los pacientes sanos intervienen tres factores: la migración microbiana, la eliminación microbiana y las

tasas de reproducción de las bacterias residentes (Dickson y col 2015). Cualquier alteración del microbioma pulmonar detectada en estados de enfermedad debe atribuirse a alguna combinación de estos tres factores (figura 7). La proporción del microbioma que reside en el pulmón de individuos sanos, aún hoy sigue siendo objeto de investigación activa. Los microorganismos penetran continuamente en los pulmones a través de la inhalación de aire (que contiene 10^4 - 10^6 células bacterianas por metro cúbico, incluso antes de llegar a las vías respiratorias superiores), la microaspiración (ubicua entre los sujetos sanos) y la dispersión directa a lo largo de las superficies mucosas. El alto grado de afiliación compartida entre el microbioma oral y pulmonar, en comparación con el aire, sugiere que la microaspiración y la dispersión directa de la mucosa contribuyen más a la migración microbiana que la inhalación de bacterias. Los microorganismos salen del tracto respiratorio vía aclaramiento mucociliar, tos (que es frecuente incluso entre sujetos sanos) y los mecanismos antimicrobianos altamente activos y diversos de la inmunidad innata y adaptativa. Las condiciones locales del crecimiento microbiano dentro del tracto respiratorio son muy heterogéneas. Dentro de un solo pulmón, se puede encontrar una drástica variación regional en cuanto a la presión de oxígeno, al pH, a la perfusión sanguínea relativa, a la ventilación alveolar relativa, a la temperatura, a la estructura de las células epiteliales, a la deposición de partículas inhaladas y la concentración y el comportamiento de las células inflamatorias. Todos estos factores, tienen efectos demostrables sobre las tasas del crecimiento microbiano. Los alvéolos distales están bañados en surfactante pulmonar, tienen actividad bacteriostática contra algunas cepas bacterianas (pero no todas), creando además presión selectiva sobre las comunidades reproductoras (Dickson y col. 2015).

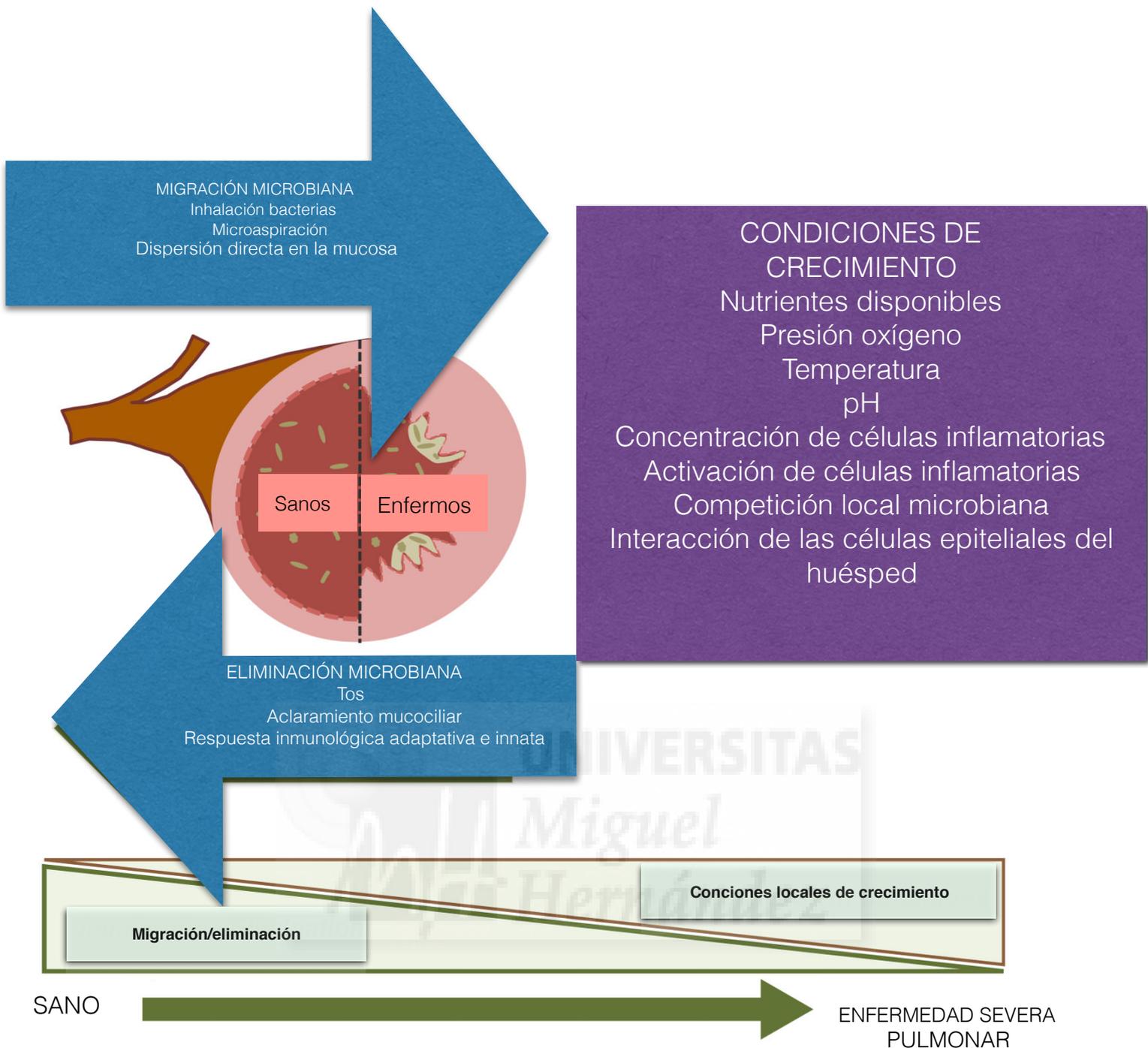


Figura 7: Determinantes del microbioma respiratorio.

Adaptado Dickson y col. (2015).

La constitución del microbioma respiratorio está determinada por tres factores: migración microbiana, eliminación microbiana y tasas de reproducción relativa de sus miembros. En sanos, la pertenencia a la comunidad está determinada principalmente por la migración y la eliminación. En la enfermedad pulmonar avanzada, la afiliación está determinada principalmente por las condiciones de crecimiento.

La enfermedad pulmonar crónica altera tanto la topografía del tracto respiratorio como la dinámica de la rotación microbiana. Las enfermedades destructivas, como el enfisema y la fibrosis pulmonar, reducen drásticamente la superficie interna de los pulmones en un 90%. La disfunción

esofágica y el reflujo son extremadamente frecuentes (> 70%) entre los pacientes con enfermedad pulmonar avanzada, aumentando la migración microbiana y la introducción de una fuente microbiana adicional (gástrica). Las enfermedades crónicas de las vías respiratorias como la fibrosis quística, la bronquiectasia y la bronquitis crónica se caracterizan por un deterioro de la depuración mucociliar, lo que perjudica la eliminación microbiana. Las mismas enfermedades se asocian con una mayor producción de moco, proporcionando tanto un medio de crecimiento rico en nutrientes como bolsas de concentración de oxígeno disminuida, y una temperatura aumentada. Las células inflamatorias de los alvéolos y las vías respiratorias son más numerosas y más activas en la enfermedad pulmonar crónica que en individuos sanos, incluso en ausencia de tabaquismo o exacerbación activa. Muchas de las terapias administradas para la enfermedad pulmonar crónica tienen efectos profundos en las condiciones de crecimiento microbiano como son: el oxígeno suplementario, y CDi, y los antibióticos sistémicos e inhalados, todos tienen efectos pleiotrópicos sobre la afluencia, el eflujo y las tasas de reproducción de la microbiota pulmonar. Como demuestra la asociación entre la gravedad de la enfermedad y la identificación de especies bacterianas persistentes ("colonizadores") a través de las técnicas basadas en el cultivo, a medida que empeora la gravedad de la enfermedad pulmonar crónica, la composición del microbioma respiratorio está menos determinada por el equilibrio de inmunización microbiana y eliminación (el determinante primario en los pulmones sanos) y más por condiciones de crecimiento local y tasas de reproducción de las bacterias residentes dentro del tracto respiratorio (Dickson y col. 2015).

En el contexto de una exacerbación respiratoria, la topografía del tracto respiratorio cambia aún más. La hiperventilación acelera la afluencia de microbios transmitidos por el aire y disminuye notablemente la temperatura de las vías respiratorias. El aumento de la tos acelera el derrame microbiano y aumenta el número y la activación de las células inflamatorias. Los subproductos de la respuesta inflamatoria del huésped tales como las citocinas inflamatorias, las catecolaminas, el aumento de la temperatura, la glucosa y la ATP libre son factores de crecimiento conocidos para especies bacterianas seleccionadas, creando condiciones de crecimiento selectivamente favorables. La broncoconstricción altera la concentración local de oxígeno y el pH. La producción aguda de moco y la permeabilidad vascular aumentan el aporte de nutrientes local. El moco de la vía aérea también introduce otros gradientes de anoxia local e hipertermia, que favorecen selectivamente el crecimiento de patógenos pulmonares específicos.

Individuos Sanos	Pacientes estables EPOC (leve a moderado)	Pacientes estables EPOC (moderado a severo)	Exacerbación EPOC
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Corynebacteria spp.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Streptococcus no hemolíticos</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus alfa-hemolíticos</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Nisseria spp.</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae (ocasional)</i>			
<i>Haemophilus influenzae (ocasional)</i>			
<i>Prevotella spp.</i>			
<i>Fusobacteria spp.</i>			
<i>Veillonela spp.</i>			

Tabla 7: Microbioma respiratorio en personas sanas, en pacientes estables con EPOC, y en pacientes con exacerbaciones de EPOC. Tabla adaptada: Beasley y col. (2012).

➤ 2.4. ROL DEL MICROBIOMA EN EPOC

➤ 2.4.1. POTENCIAL ROL DE LAS BACTERIAS EN PACIENTES EN FASE ESTABLE

El papel de los microorganismos, especialmente de las bacterias, en la historia natural de la EPOC es un tema controvertido y un tópico muy debatido. Son la principal causa de las exacerbaciones de la enfermedad, pero su papel durante las fases de estabilidad no está claro, aunque varios estudios sugieren que contribuyen a la inflamación crónica, que dan lugar cambios radiológicos, y a cambios patológicos en la respuesta inmune local y a un incremento de los síntomas de la EPOC, y que todo de ello conduce a la progresión de la enfermedad (Rangelov y

Sethi 2014, Sethi y Murphy 2008, Matkovic y Miravittles 2013). Este aspecto se ve reforzado por la hipótesis del círculo vicioso que intenta explicar cómo la colonización perpetúa la inflamación y contribuye al progreso de la EPOC. Una vez que los microorganismos han accedido a las vías respiratorias inferiores debido a los defectos en el sistema mucociliar, el aumento en la producción de moco, el daño en el epitelio, la represión en la producción de IgA y la disminución de la capacidad fagocítica celular, característicos de la enfermedad, facilitan la colonización de la vía aérea y provoca un aumento de la respuesta inflamatoria. Tanto la propia bacteria como el daño que genera en el epitelio contribuyen a alterar la respuesta inmune del huésped, de forma que más microorganismos son capaces de persistir en las vías respiratorias inferiores, formándose un ciclo vicioso de inflamación crónica y colonización bronquial mantenida en el tiempo (Rangelov y Sethi 2014, Sethi y Murphy 2008).

Las bacterias aisladas se clasifican en microorganismos potencialmente patógenos (MPPs) y microorganismos no reconocidos como potencialmente patógenos (nMPPs) (tabla 7). La colonización crónica por MPPs contribuye a la progresión de la enfermedad al amplificar la respuesta inflamatoria. Entre un 25-50% de los pacientes con EPOC estable, se han podido identificar bacterias potencialmente patógenas mediante la utilización de técnicas que están basadas en el cultivo (Sethi y Murphy 2008). Una limitación de estas técnicas de cultivo es, sin embargo, la posibilidad de contaminación durante la recogida de muestras biológicas con las vías respiratorias superiores. Por otra parte, más del 70% de las especies bacterianas no se pueden ser cultivar o no pueden ser cultivadas por las técnicas actuales y muchas de las especies restantes son muy difíciles de cultivar. El desarrollo de técnicas no basadas en el cultivo, como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), han mejorado la capacidad de detectar bacterias y han demostrado que los pulmones no son estériles y que la mezcla de especies bacterianas que componen el microbioma pulmonar contribuye al estado patológico en las enfermedades respiratorias crónicas (Silvestro ennio y col. 2016).

Las vías respiratorias bajas en pacientes con EPOC están colonizadas por MPPs como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* y, en pacientes con enfermedad más grave, por *Pseudomonas aeruginosa* (Patel y col. 2002, Miravittles y col. 1999, Hill y col. 2000). Algunos estudios de EPOC en estado estable han observado una correlación directa entre la inflamación de las vías respiratorias y la carga bacteriana, por ejemplo Hill y col. (2000), que realizaron cultivos de esputo en 160 pacientes con EPOC estable, 55 con niveles normales de 1-antitripsina en sangre, 62 con deficiencia severa de alfa-1-antitripsina, y 43 con bronquiectasias idiopáticas, y observó que la carga bacteriana se correlaciona con la inflamación de

las vías respiratorias en pacientes con bronquitis crónica estable. Garcha y col. (2012), estudiaron muestras de esputo de 134 pacientes por qPCR y observaron que en EPOC estable, una mayor carga bacteriana se correlacionaba con una obstrucción bronquial mucho más grave, dosis más altas de corticosteroides inhalados, y un nivel mayor de proteína C reactiva (PCR). Más recientemente, Barker y col. (2015) estudiaron muestras de esputo de 120 pacientes con EPOC estable y esputo pareado en 55 sujetos con enfermedad estable y exacerbada. Usando qPCR, observaron que la mayoría de los pacientes en un estado estable (76%) tenían bacterias patógenas en sus vías respiratorias. La detección de bacterias por medio de técnicas no basadas en el cultivo, tales como qPCR, también se asoció con el aumento de la interleucina (IL) -1, IL-10 y el factor de necrosis tumoral y disminuyó el ligando 13 de la quimiocina (motivo C-C). En un estado estable, la relación más fuerte entre la carga bacteriana, la inflamación y los síntomas se observó con *H. influenzae*, ya sea en combinación con otras bacterias o como único patógeno. Singh y col. (2014), analizaron el esputo de 99 pacientes con EPOC estable por qPCR y observaron una correlación directa entre la carga de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* y la inflamación de las vías respiratorias y el fibrinógeno plasmático. Erb-Downward y col. (2011) analizaron el lavado broncoalveolar de tres pacientes que nunca habían sido fumadores, siete fumadores sanos, cuatro pacientes con EPOC y ocho muestras obtenidas de seis pacientes sometidos a trasplante pulmonar para EPOC. Se encontró una carga bacteriana significativa en todos los sujetos sin diferencias significativas entre los grupos. En algunos fumadores con función pulmonar normal, los autores encontraron una menor diversidad de microbiota pulmonar y especularon que esta reducción relativa en la diversidad podría ser persistente y podría ser un "efecto" de la inflamación pulmonar o, en parte, una "causa" del inicio y progresión de la enfermedad.

Los aspectos moleculares de estas modificaciones dinámicas en la carga bacteriana y tipos bacterianos en relación con la respuesta inmune del paciente necesitan estudiarse más en profundidad. Se ha planteado la hipótesis de que la aparición de nuevas cepas de bacterias extrañas inicia un ciclo de infección, una respuesta inflamatoria y una remodelación disfuncional que impulsa la progresión de la EPOC (Hill y col. 2000 y Sethi y col. 2002).

Sze y col. (2012), analizaron muestras de resecciones quirúrgicas de pulmón y donantes de trasplante de pulmón de fumadores (ocho muestras), no fumadores (ocho muestras), pacientes con EPOC (ocho muestras) y pacientes con fibrosis quística (ocho muestras). Ellos mostraron diferencias en la comunidad bacteriana del tejido pulmonar de EPOC en comparación con otros grupos. Las *Actinobacterias* fueron más abundantes en el grupo de fumadores, mientras que *Lactobacillus spp.* estuvo presente de forma más frecuente en el grupo (GOLD) 4 de la EPOC. En

los grupos de fibrosis quística y EPOC, el género *Burkholderia* representaron más del 5% de la comunidad bacteriana. El aumento de la presencia de *Lactobacillus spp.* en el pulmón podría estar relacionado con un estado inflamatorio asociado a la formación de folículos linfoides terciarios que se desarrollan cerca de las vías aéreas pequeñas. El lactobacilo podría ser el cuasante de la inflamación o, alternativamente, podría actuar como un modulador inmunológico y ayudar a la respuesta inflamatoria. En su estudio, los autores demostraron que en el grupo muy severos de EPOC, hubo un cambio en la abundancia relativa de unas pocas poblaciones bacterianas sin que ninguna de ellas se hiciera dominante.

La relación entre la abundancia relativa y la "diversidad" de la población bacteriana en la EPOC ha sido estudiada por diversos autores. Garcia-Núñez y col. (2014), estudiaron con técnicas no basadas en el cultivo, el microbioma bronquial en el esputo de 17 pacientes con EPOC estable y observaron que en los pacientes con enfermedad más grave predominaba el filo de *Proteobacteria* junto con una disminución de bacterias pertenecientes al filo de los *Firmicutes*. Los autores especularon que los cambios en el microbioma pulmonar en pacientes con EPOC más grave podrían deberse a alteraciones de las vías respiratorias típicas de pacientes muy graves o al uso repetido de antibióticos. La alteración en la composición del microbioma observada puede inducir una inflamación pulmonar adicional que contribuye al empeoramiento de la enfermedad. Más recientemente, Sze y col. (2015), al examinar 40 muestras de pulmón de cinco sujetos con COPD (GOLD etapa 4), confirmaron la reducción de la diversidad microbiana con un aumento relativo de *Proteobacteria* y *Actinobacteria* y una reducción de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Los autores, además, informaron de una asociación significativa entre las alteraciones del microbioma, la extensión del enfisema, la remodelación de los bronquios y los alvéolos y su infiltración por las células T CD4. Sze y col. plantean la hipótesis de que el aumento de la abundancia de *Proteobacteria* y *Actinobacteria* en las vías respiratorias COPD (GOLD etapa 4) podría estimular una inflamación pulmonar más intensa. Todos estos hallazgos anteriores, contrastan con otros estudios como el de Pragman y col. (2012) en muestras de LBA de 22 pacientes con EPOC moderada a severa y diez controles y el de Wu y col. (2014), que analizaron el esputo de diez EPOC y de sujetos control. La discrepancia podría deberse al escaso número de pacientes analizados en estos estudios y a diferencias en el diseño del estudio. Además, el estudio de Erb-Downward y col. (2011) se basó en muestras obtenidas de LBA y cepillados bronquiales, mientras que en el estudio de Sze et al. (2012) y (2015), las muestras se obtuvieron a partir de tejido pulmonar, haciendo los resultados menos directamente comparables. Una limitación del estudio de Sze y col. (2012) es la ausencia de un grupo moderado y grave de EPOC (GOLD etapa 2 y 3) que

deja abierta la cuestión de si la aparición de *Lactobacillus spp.* y *Burkholderia spp.* en los pulmones es gradualmente progresiva o un proceso repentino. Pragman y col. (2012), estudiaron muestras de LBA mientras que García-Nuñez y col. (2014) analizaron muestras de esputo. Otros factores que influyen en los hallazgos son la heterogeneidad de la población de EPOC: en algunos pacientes, hay predominio de enfisema, mientras que en otros, prevalece la bronquitis crónica. Además, los diferentes fármacos utilizados para tratar la enfermedad en pacientes con EPOC podían haber alterado el microbioma pulmonar: algunos pacientes fueron tratados con antibióticos y otros con esteroides o beta-2-agonistas. En estos estudios no se ha descrito un periodo de aclaramiento bien definido del uso de antibióticos y corticosteroides. Algunos estudios consideraron que los pacientes con EPOC en estado estable eran aquellos que habían transcurrido 4 semanas desde la última exacerbación (Barker y col. 2015; Singh y col. 2014; Erb-Downward y col. 2011, Sethi y col. 2002, Sze y col. 2012, Pragman y col. 2012, Wu y col. 2014, Garcia-núñez y col. 2014, Sze y col. 2015, Huang y col. 2010, Millares y col. 2014, Huang y col. 2014). Un estudio si indicó los antibióticos utilizados durante la fase de exacerbación de los pacientes, pero no hay datos disponibles sobre la dosis de corticosteroide durante esa fase (Huang y col. 2014). Dado que muchos de estos estudios utilizan una PCR cuantitativa retrotranscripción inversa (qRT-PCR) para la evaluación de microbiomas, es obligatorio definir con precisión los tratamientos farmacológicos y la duración del aclaramiento de los antibióticos y corticosteroides.

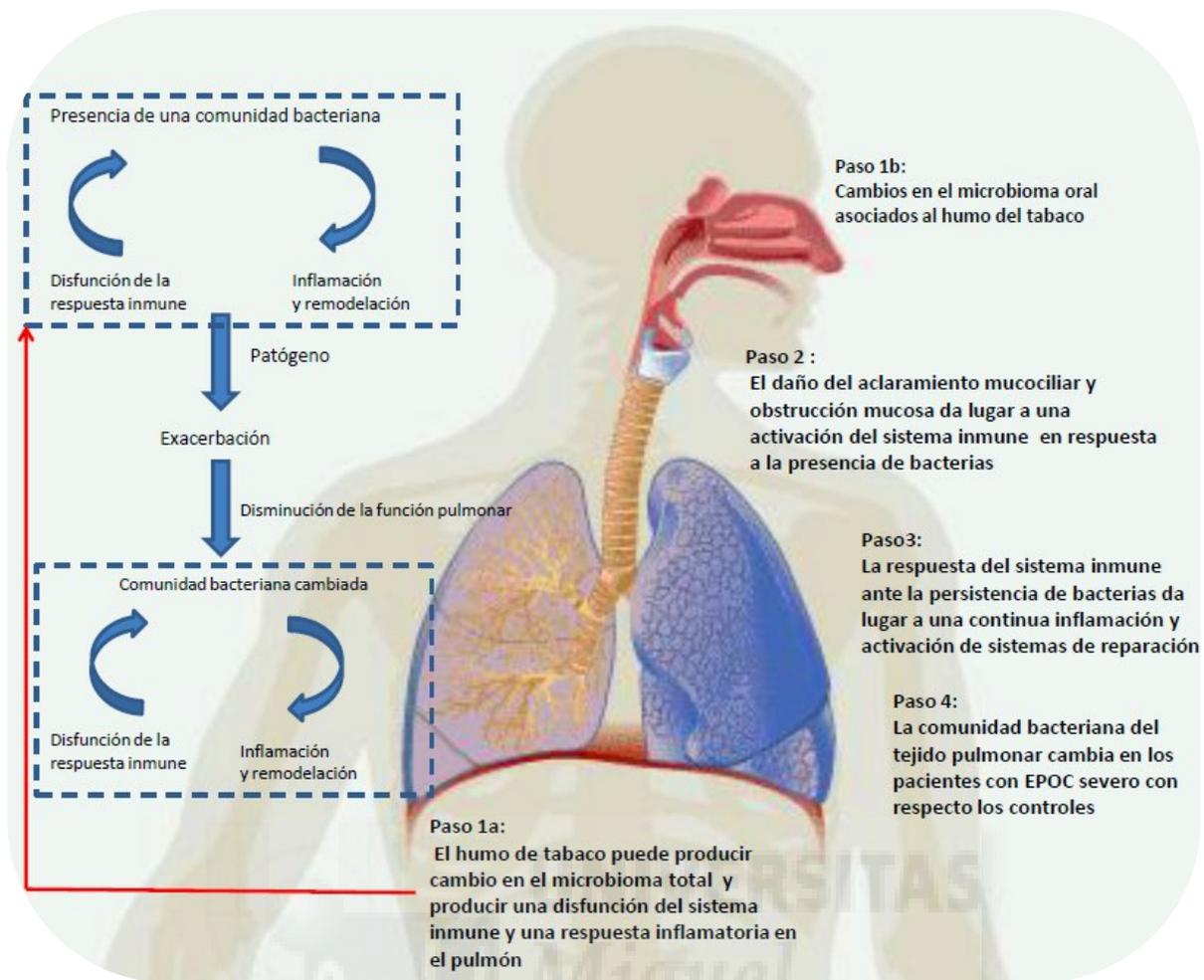


Figura 8: Potencial papel de la microbiota bacteriana en la patogénesis de EPOC. Adaptado Sze y col.

2014

En este mismo sentido Einarsson y col. 2016, comparó la microbiota de las vías respiratorias bajas en pacientes con EPOC, en fumadores y no fumadores ambos dos últimos sin patologías respiratorias mediante el cultivo y la secuenciación (*Illumina MiSeq*). Concluyendo que el cultivo no mostró diferencias en la carga total de bacterias aeróbicas y anaerobias entre las tres cohortes. Sin embargo la secuenciación reveló, que la prevalencia de miembros de *Pseudomonas spp.* fue mayor en las vías respiratorias inferiores de los pacientes con EPOC, pero la mayoría de las secuencias para este taxón se atribuyeron a tres pacientes. Además, se observó que los miembros de *Bacteroidetes*, tales como *Prevotella spp.*, eran mayores en los grupos de comparación “sanos”. La diversidad de la comunidad (α y β) fue significativamente menor en la EPOC en comparación con los grupos sanos. También se observó la co-ocurrencia de taxones bacterianos y la observación de una supuesta comunidad "núcleo" dentro de las vías respiratorias inferiores.

➤ 2.4.2. POTENCIAL ROL DE LAS BACTERIAS EN PACIENTES CON EPOC DURANTE LAS EXACERBACIONES

El papel de los patógenos bacterianos durante las exacerbaciones de la EPOC está en constante investigación. Las exacerbaciones de la EPOC están asociadas con cambios en la microbiota respiratoria y la inflamación de las vías respiratorias. Por otro lado, cuando hay manifestaciones clínicas de infección bacteriana, en más del 50% de las exacerbaciones, no se recuperan mediante cultivo los microorganismos patógenos, y además estas técnicas convencionales están más centradas en el diagnóstico microbiológico de patógenos convencionales. Sin embargo, las actuales técnicas del estudio del microbioma han arrojado nuevos resultados, ya que no solo se han encontrado los patógenos habituales sino que también otras especies, sugiriendo así que el rol de las bacterias en la exacerbación es más complejo que lo que se pensaba inicialmente.

En 2002, Sethi y col. siguieron a 81 pacientes con EPOC durante 56 meses, estudiando muestras de esputo con técnicas basadas en el cultivo durante la enfermedad estable y las exacerbaciones, observaron que el aislamiento de nuevas cepas de patógenas estaba asociado con un mayor riesgo de exacerbaciones.

Huang y col. (2010), estudiaron a ocho pacientes ingresados en una unidad de cuidados intensivos con exacerbación de EPOC. Se obtuvieron muestras a partir de aspirados endotraqueales. Utilizando una qPCR, los autores observaron una mayor diversidad de bacterias de las que hasta ahora se habían obtenido por técnicas tradicionales como las del cultivo. Se aislaron múltiples especies bacterianas orofaríngeas e intestinales, lo que sugiere un potencial rol de estas cepas en las exacerbaciones de la EPOC. Huang y col., planteó la hipótesis que eran principalmente dos grupos de bacterias de la microbiota las que estaban relacionadas con la exacerbación de EPOC, una caracterizada por una prevalencia de *Proteobacterias*, la otra por una prevalencia de *Firmicutes*, que podría estar asociada con mayor diversidad. Los pacientes del grupo con prevalencia de *Firmicutes* fueron aquellos que tuvieron un período de intubación más corto antes de realizar el aspirado endotraqueal. Por otra parte, una disminución de la diversidad bacteriana se correlacionó con una mayor duración de la intubación. Se puede especular que el tratamiento con antibióticos podría haber reducido la diversidad bacteriana. Las limitaciones de este estudio fueron la ausencia de muestras de control no intubados de EPOC y pacientes sin EPOC y la falta de una dimensión longitudinal. Millares y col. (2014), analizaron muestras de esputo pareados de pacientes con EPOC antes y durante las exacerbaciones y encontraron que las exacerbaciones se asociaron con un aumento selectivo en la abundancia relativa de bacterias típicamente asociadas con exacerbaciones

(por ejemplo, *Haemophilus spp*, *Pseudomonas spp.* y *Moraxella spp.*) a pesar de la detección inconsistente en el cultivo.

Huang y col. (2014), examinaron el microbioma en muestras de esputo en serie ya que se recogieron antes, durante y después de 12 episodios de exacerbación en un estudio longitudinal de infección bacteriana en la EPOC. Específicamente, dos muestras de esputo antes de la exacerbación, una cuando el paciente presentó la exacerbación pero antes del tratamiento y dos muestras después de la resolución clínica de la exacerbación. El ADN de las muestras de esputo se detectó con un microarray de ADN *Phylochip*. Los microbiomas de las dos muestras de pacientes estables antes de la exacerbación fueron similares, lo que sugiere la estabilidad a corto plazo del microbioma en un individuo en EPOC estable. Con el inicio de la exacerbación, no se observaron cambios en la riqueza, uniformidad y diversidad de la comunidad. Sin embargo, se observaron cambios significativos en la composición taxonómica con un aumento en *Proteobacteria* y una disminución en *Actinobacteria*, *Clostridia* y *Bacteroides*. Otra interesante observación fue que en la exacerbación, cuando un patógeno conocido como *Haemophilus influenzae* aumentaba, los taxones bacterianos estrechamente relacionados con este en el árbol filogenético también se enriquecieron, mientras que los taxones que filogenéticamente distantes disminuyeron. Esto sugiere que la dinámica de microbiomas y el enriquecimiento de taxones estrechamente relacionados con un patógeno dominante que podría contribuir a la patogénesis de la exacerbación. La disponibilidad de muestras sistemáticamente recogidas después de la exacerbación proporcionó la oportunidad de evaluar el efecto del tratamiento en el microbioma de las vías respiratorias en la EPOC. El tratamiento con sólo esteroides sistémicos orales resultó en una mayor carga bacteriana y demostró el enriquecimiento de muchos taxones incluyendo miembros de *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Por el contrario, el tratamiento con sólo antibióticos redujo la abundancia bacteriana, particularmente en los miembros de *Proteobacteria*. Se observó un patrón mixto cuando se usaron tanto antibióticos como esteroides.

Su y col. 2015, en este estudio, el uso de técnicas microbiológicas moleculares proporcionó una visión de las diversidades fúngicas y bacterianas en pacientes con exacerbación aguda de EPOC durante la hospitalización. En particular, se examinó la estructura y variedades de la comunidad microbiana pulmonar en 6 pacientes con exacerbación aguda grave utilizando la plataforma de secuenciación Illumina. El análisis de secuencias mostró 261 géneros bacterianos que representan 20 filos distintos, con un promedio de géneros por paciente de > 157 , lo que indica una alta diversidad. Los géneros de *Acinetobacter*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Streptococcus*, *Veillonella* y *Acomnaccia* fueron los más comúnmente identificados, y

el número medio de secuenciación total por muestra de esputo fue > 10000 secuencias ITS 18S. La población de hongos estaba dominada por *Candida spp.*, *Phialosimplex spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.* y *Eutypella spp.*. Estos resultados ponen de relieve que los pacientes con EPOC tienen estructuras y variedades personalizadas en la comunidad microbiana de esputo durante los períodos de hospitalización, y que hay variaciones en la dinámica diaria de las comunidades bacterianas y fúngicas entre los pacientes con EAPOC.

Sin embargo, para una mejor comprensión del papel del microbioma en las exacerbaciones de la EPOC, es necesario realizar estudios longitudinales en condiciones de exacerbación después de un período de estabilización suficientemente amplio, incluyendo los sometidos a tratamientos farmacológicos, así como inclusión de controles no tratados. De forma paralela se debería realizar un análisis, de la respuesta inmunológica del huésped asociada con estos diferentes estados clínicos en pacientes con EPOC y también necesita que ésta se estudie longitudinalmente.

Así, en este sentido, Wang y col. (2016), realizó un estudio longitudinal con 16s ARNr para analizar el microbioma pulmonar en 476 muestras de esputo recogidas de 87 sujetos con EPOC en cuatro visitas definidas como estado estable, exacerbación, 2 semanas después de la terapia y 6 semanas de recuperación. Su análisis reveló una microbiota pulmonar dinámica donde los cambios parecían estar asociados con eventos de exacerbación e indicativos de fenotipos de exacerbación específicos. Los tratamientos con antibióticos y esteroides parecen tener efectos diferenciales en el microbioma pulmonar. Además, describieron una red de interacción microbiana para el microbioma pulmonar y sugirieron que la perturbación de algunas unidades taxonómicas bacterianas operativas, en particular *Haemophilus spp.*, podría tener un gran impacto en la estructura de la comunidad microbiana en general. Además, varios biomarcadores de suero y esputo, en particular la interleucina-8 de esputo, parecen estar altamente correlacionados con la estructura y diversidad del microbioma.

➤ 2.4.3. POSIBLES ROLES DE LA MICROBIOTA RESPIRATORIA NO BACTERIANA EN LA EPOC.

Las comunidades bacterianas han sido el principal objeto de los estudios de microbioma pulmonar hasta la fecha. Las posibles razones son debidas a que implican una mayor accesibilidad, en relación con la microbiota no bacteriana, y a que los métodos y las bases de datos están relativamente mejor establecidas para la caracterización de comunidades bacterianas, ya que están precedidas por décadas de trabajo en el campo de la ecología ambiental. Existe un creciente interés por identificar el espectro de la microbiota fúngica presente en las vías respiratorias, pero los estudios de hongos son, en general, más difíciles. Hay pocos datos basados en el cultivo sobre los tipos de hongos que pueden ser importantes en la EPOC, ya que los métodos de cultivo fúngico en los laboratorios de microbiología clínica son subóptimos. Más recientemente, varios grupos de investigación con experiencia específica en la secuenciación de hongos han informado sobre el rango de especies de hongos potencialmente albergados en el tracto respiratorio. En contraste con el aprovechamiento del conocimiento sobre el gen 16S ARNr ampliamente conservado para el perfil de las bacterias, no existe una correlación directa con el reino fúngico (Huang y col. 2016). La región espaciadora de transcripción interna (ITS) ha sido la región de ADN más ampliamente secuenciada en los estudios de ecología molecular de hongos, pero hay una gran selectividad en la detección de especies dependiendo de la región elegida (Cui y col. 2013). Además, las bases de datos de referencia para secuencias de hongos y genomas no están tan bien estudiadas y establecidas, con lo cual esto supone una limitación en la identificación de especies.

A la luz de estos desafíos a los estudios de secuenciación pan-fúngicos, parece razonable sugerir una reflexiva consideración de los objetivos de tales estudios y la utilidad de la información obtenida. Un análisis reciente de las comunidades de hongos en el esputo de pacientes con fibrosis quística observó mayores fluctuaciones en la riqueza fúngica, lo que contrastaba con la riqueza bacteriana (Kramer y col. 2015). Aunque los tratamientos crónicos con antibióticos durante este período pudieron haber influido en los hallazgos, los investigadores concluyeron que los elementos fúngicos detectados en el esputo de los pacientes con fibrosis quística son predominantemente transitorios.

En algún estudio, como el de Morris y col. (2008) se han observado asociaciones entre la colonización de *Pneumocystis jiroveci* y la EPOC. Un patógeno fúngico eucariota, y una causa familiar de neumonía en huéspedes inmuno-comprometidos, y este se ha observado que coloniza las vías respiratorias de los pacientes con EPOC más comúnmente que los de los controles sanos. Por

otra parte, independiente de la historia del tabaquismo, la prevalencia de la colonización está positivamente correlacionada con el grado de obstrucción del flujo aéreo y por lo tanto la gravedad de la EPOC, como puso en marcha la Iniciativa Mundial sobre la Salud de la Enfermedad Obstructiva Enfermedad Pulmonar. Estos hallazgos sugieren que el ecosistema de las vías respiratorias de los pacientes con obstrucción más severa del flujo aéreo representa un ambiente adecuado para la colonización de *Pneumocystis*, lo que puede afectar la progresión de la EPOC. Más recientemente Su y col. (2015), ya mencionado con anterioridad, realizó un estudio en pacientes hospitalizados con exacerbación aguda, y encontró que en muestras de esputos expectorados los hongos más frecuentemente encontradas son *Candida spp.*, *Phialosimplex spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.* y *Eutypella spp.*

En cuanto a papel que juegan los virus, algunos autores sugieren que en los pacientes con EPOC estable, la colonización por virus (especialmente virus *influenza* y *coronavirus*) podría jugar un rol importante en el mantenimiento de la inflamación (Mallia y col. 2012; Utokaparch y col., 2012), sin embargo dicho papel se ha de estudiar más exhaustivamente bajo condiciones estandarizadas de tratamiento. En cuanto al papel de los virus en las exacerbaciones de EPOC, los más comúnmente encontrados son el *Rhinovirus*, *virus influenza* (De Serres y col. 2009; Kherad y col. 2010). Recientemente, Molyneaux y col. (2013) analizó un modelo humano experimental de las exacerbaciones inducidas por rinovirus en la EPOC también ha revelado algunas observaciones interesantes sobre los cambios en el microbioma con exacerbación. Estos autores inocularon *Rhinovirus* intranasalmente a 31 pacientes (con sujetos control = 17, sujetos moderados con EPOC = 14). En estos sujetos se recogieron muestras de esputos antes de la inoculación (Día 0) y a los 5, 15 y 42 días después de la inoculación del rinovirus. Los parámetros estudiados fueron niveles de rinovirus, el microbioma, la abundancia bacteriana y parámetros inflamatorios. Observándose, un aumento significativo de la abundancia bacteriana en los pacientes con EPOC, pero no en el grupo de control, el cual se correlacionó con un aumento de la concentración de neutrófilos y de los niveles de elastasa de neutrófilos. La composición del microbioma cambió sólo en el grupo con EPOC, con una disminución de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, y un 21% de aumento en *Haemophilus* y un 9,5% de aumento en *Neisseriaceae*. De forma paralela Wilkinson y col. (2006), observaron que las exacerbaciones de la EPOC debidas a una coinfección por rinovirus y *H. influenzae* se asocian con un nivel aumentado de IL-6 en suero comparado con exacerbaciones en las que sólo se aisló un patógeno. Estos hallazgos, también, similares han sido reportados por Mallia y col. (2012) los autores observaron que el 60% de los pacientes con EPOC experimentaron una infección bacteriana secundaria después de ser infectados con rinovirus.

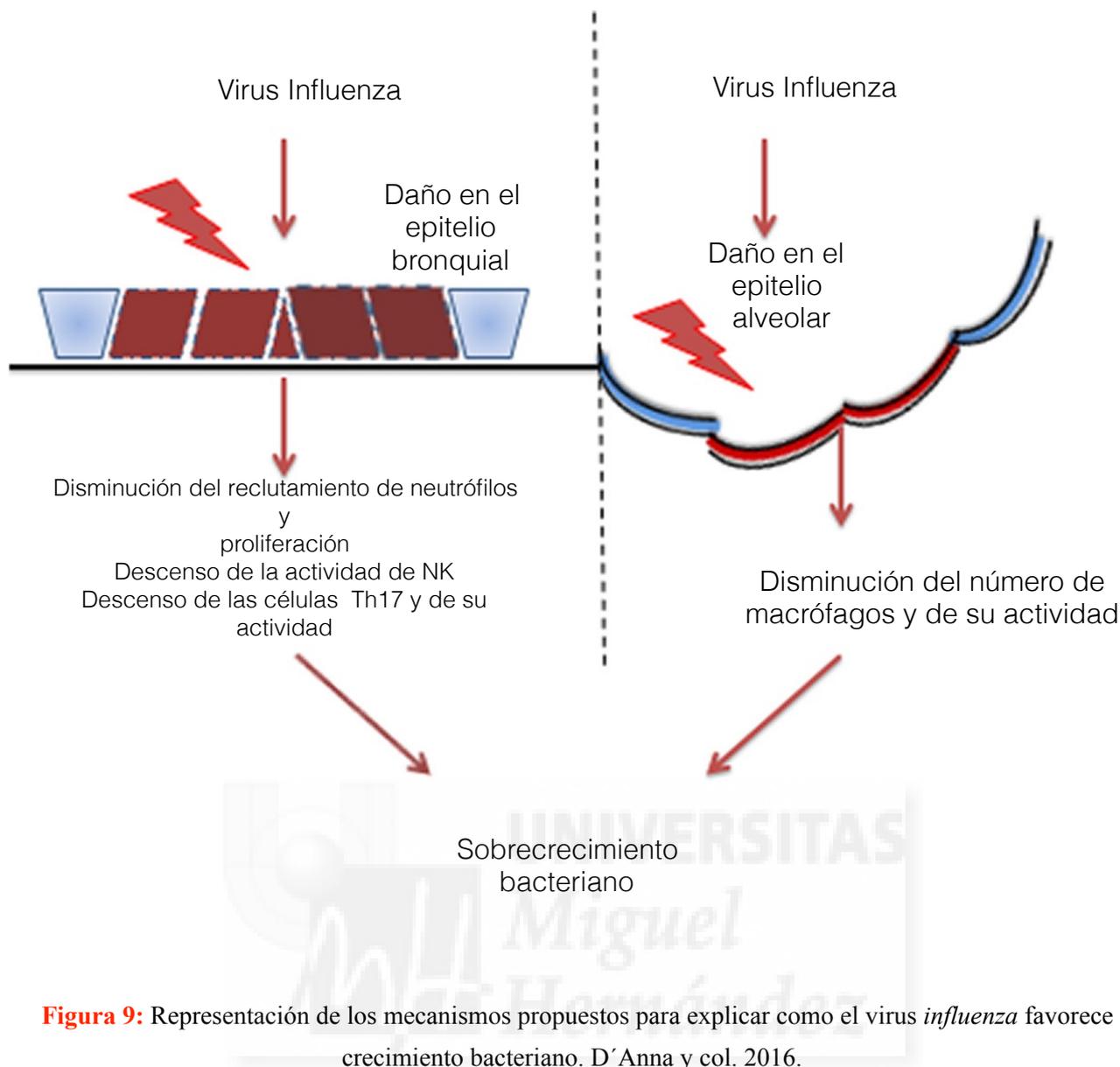


Figura 9: Representación de los mecanismos propuestos para explicar como el virus *influenza* favorece el crecimiento bacteriano. D'Anna y col. 2016.

Estos datos han sido confirmados por análisis histológicos de muestras de pulmón infectadas de pacientes fallecidos a partir de *influenza* tipo A de 1918 y H1N1 en 2009 (Morens y col. 2008, Bautista y col. 2010, y CDC 2009). En estos pacientes, la causa predominante de muerte fue una superinfección bacteriana que resultó en una neumonía bacteriana secundaria. En los ratones, la infección del virus de la *influenza A* aumenta la susceptibilidad a infecciones respiratorias bacterianas como *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *H. influenzae* (Ballinger y Standford 2010, Jamieson y col. 2010). El virus de la *influenza* puede causar esta susceptibilidad a la superinfección bacteriana a través de diversos mecanismos. El daño de las células epiteliales y las alteraciones del epitelio por infección viral pueden facilitar la colonización bacteriana de las vías respiratorias (Plotkowski y col. 1986). Otro modo por el cual el virus de la *influenza* puede favorecer la infección bacteriana es alterando la función del sistema inmunológico encargado del control de la replicación bacteriana (Figura 9).



JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

➤ JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), es el proceso respiratorio crónico que origina una mayor alteración de la calidad de vida de los pacientes, ingresos hospitalarios y gasto farmacéutico. En este proceso, la infección de la vía respiratoria es una característica fundamental para entender su evolución y pronóstico.

La prevalencia actual de EPOC, definida por el criterio GOLD como un cociente $VEF_1/CVF < 0,70$ post-broncodilatador en la población de 40-80 años fue del 10,2% (el 15,1% en hombres y el 5,7% en mujeres) (Miravittles y col. 2009).

La EPOC es actualmente la cuarta causa de muerte en el mundo y la OMS estima que será la tercera en el año 2030. En el año 2008, las enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores representaron la cuarta causa de muerte en España (responsables del 11,4% del total de defunciones), después del cáncer (26,1%), las enfermedades del corazón (20,8%) y las enfermedades cerebrovasculares (18,2%) (Regidor y col. 2011).

La EPOC es una alteración compleja y heterogénea que varía de un paciente a otro en varios aspectos, como las áreas clínica (síntomas, progresión, fenotipos, etc.), funcional y radiológica (otros fenotipos), que produce una carga económica y social sustancial que va en aumento. Con lo cual es necesario un mayor seguimiento de pacientes para entender mejor la complejidad de la EPOC y la relevancia clínica del microbioma pulmonar.

En la práctica clínica actual, mediante métodos clásicos (cultivo de muestras respiratorias) se han tratado de identificar los microorganismos implicados en las exacerbaciones y en función de estos datos, instaurar en el paciente, el tratamiento antibiótico adecuado con el fin de cortar la respuesta inflamatoria que favorece la progresión de la lesión pulmonar. Sin embargo, se conoce que los métodos clásicos de cultivo son herramientas obsoletas a la hora de identificar poblaciones bacterianas y fúngicas tan complejas como las que están presentes en las vías respiratorias de un paciente, ya que hay muchos microorganismos que no se pueden aislar por problemas metodológicos, como los microorganismos anaerobios, microaerófilos, etc. Por este motivo, los tratamientos antibióticos y antifúngicos que actualmente se administran, generalmente de forma empírica, se basan en recomendaciones y protocolos que se han diseñado en base a datos parciales y pueden no recoger la situación real de las necesidades del paciente

La metagenómica, nueva herramienta sensible y específica respecto a los métodos clásicos de diagnóstico, nos permite estudiar las poblaciones bacterianas presentes en la mucosa respiratoria, y se presenta como una alternativa útil para conocer la microbiota de estos pacientes, lo cual podría ser relevante tanto para el manejo clínico de los mismos, como para el diseño de protocolos de tratamiento empírico.

➤ **OBJETIVO GENERAL**

Comparar los métodos microbiológicos clásicos y las nuevas técnicas metagenómicas en enfermos con EPOC, valorando la utilidad clínica de la nueva metodología.

➤ **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Caracterizar y cuantificar mediante técnicas de metagenómica las distintas especies bacterianas totales presentes en las vías respiratorias en dos grupos independientes de pacientes con EPOC (pacientes estables con EPOC leve-moderado y pacientes estables con EPOC graves-muy graves).
- 2) Comparar las nuevas técnicas metagenómica basadas en la secuenciación de ADN y ARN ribosomal frente a las técnicas microbiológicas clásicas (cultivo) en el diagnóstico microbiológico de estos procesos y determinar su utilidad clínica.
- 3) Observar si existen cambios en la biodiversidad y carga bacteriana en función de la gravedad de la enfermedad EPOC.

MATERIAL Y MÉTODOS



UNIVERSITATIS
Miguel
Hernández

➤ 1. MATERIAL: REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS UTILIZADOS

➤ 1.1 REACTIVOS:

- Flumil (N-acetil-cisteína). PHARMAZAM, S.A. (Grupo *Zambon*)
- Chelex-100 forma sódica. Ref: 7901 *Sigma-Aldrich* (USA)
- Agua destilada (1000 ml), 10 unidades/caja. *Grifols*
- Bromuro de etidio (EtBr). Solución al 1%. *AppliChem*
- Glicerol 98%. Ref: 24387.292VWR AKRALAB, Prolabo 1L. *Rectapur. International* S.A.S.
- Agar Columbia + 5% sangre de cordero. Ref: 43041. *Biomerieux*
- Agar Chocolate + PolyViteX (PVX). Ref: 43101. *Biomerieux*.
- Agar MacConkey Ref: 43141. *Biomerieux*
- Agar Saboreaud. Ref: 43171. *Biomerieux*
- Agar BCYE . Ref: L007349. *BD (Becton, Dickinson and Company)*.
- Marcador peso molecular (100bp ladder). Ref.:10488058. *Invitrogen TrackIt™*
- Gel Red. Ref: 41000. *Biotum*
- Kit Taq polimerasa *Ecotaq Boline* Ref: Bio-21040. *Ecogen*.
- *Extensor Long range PCR Enzyme. Thermo Fisher Scientific.*
- *Minielute PCR purification Kit. Ref.: 28004. Quiagen*
- TRIS. Ref: 154563-500. *Sigma-Aldrich*
- EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic Acid) (C₁₀ H₁₄N₂ O₈Na₂ · 2 H₂O₂). Ref: 431778-100. *Sigma*
- Ácido bórico: Boric acid PA-ACS-ISO (H₃BO₃). M=61,83. *Panreac Química S.A.* E-08110
- Agua libre de nucleasas. Ref: AM9932. *Life Tech*
- Lisozima. Ref: L6876. *Sigma-Aldrich*
- Proteínasa K. Ref: 19133. *Quiagen*
- SDS. Ref: L4390. *Sigma-Aldrich*
- CTAB (Hexadecyltrimethylamonium bromide) (C₉H₄₂ BrN), (364.45 g/mol. P code: 113090072 52365-50G. *Bio Ultra. Sigma Aldrich*

- Fenol-Cloroformo. Ref: P2069. *Sigma-Aldrich*
- Etanol absoluto (CH₃CH₂OH). Ref: 20820.293. *Prolabo*
- Isopropanol. Ref: I9516. *Sigma*
- Dnase. Ref: AM1906. *Life Tech*
- RNase. Ref: R6513. *Sigma*
- Suero fisiológico. Ref:10ml *B.Braun*
- *AMPure beads (Agencourt, USA)*
- *Ultrapure™ Agarosa 100g. Ref: 15510-D19. Invitrogen*
- *KIT MMLV retrotranscriptase Ref. : 28025-013. Life Tech*
- *Rnase OUT inhibitor. Ref.: 10777-019. Life Tech*
- *Random Hexamers. Ref: N8080127. Life Tech*
- *dNTP Set Sol. Ref: R0181. Thermofisher*
- *dNTP mix. Ref: BIO3905. Ecogen*
- *Titanium Sequencing kit XLR7. Ref: 05233526001. Quiagen*
- *GS Titanium PicoTiter Plate kit. Ref: 05233682001. Quiagen*
- *Solución de Cloruro Magnésico. 50 mM (conservación -20°C). Lote:MG-109-A. Ecogen*
- *Tampón 10x (sin Mg) (conservación -20°C). Lote: NH-109D. Ecogen*

➤ 1.1.1 PRIMERS, CEBADORES, Y SONDAS

- *Primers previos a la secuenciación parcial del 16 S ARNr. Ecogen. DNA Stab VIDA:*

1492-R : 5' TAC GGY TAC CTT GTT AGC ACTT-3'

27-F : 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

- *Primers de amplificación previa a la pirosecuenciación. Thermo Fisher Scientific.*

● **Primer 27F- MID (Primer Forward; A-Key):**

Titanium-LibL-A-27F-21

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCACAAAGTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-22

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCATCGTTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-23

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGTACGATCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-24

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGTCTGTGTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-25

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATAAGGCGTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-26

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATATCGGCTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-27

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCCGGATTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-28

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCGCCAATCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-29

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATGGATCGTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-30

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATTAGGCCTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-31

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAAGACGATCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-32

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAAGGTTCTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-33

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCACACACATCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-34

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCACTACTCTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-35

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCACTTGAGTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-36

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCACTTGAGTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-37

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAGACATCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-38

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCATGTCCTTCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-39

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCAACGTATCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

Titanium-LibL-A-27F-40

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCAAGGAATCAGAGTTTGATCMTGG
CTCAG

● **Primer 533 (Reverse primer; B-key):**

Titanium-LibLB-533R

CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGGCTTACCGCGGCKGCTGGCACG

8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

533R (5'-TTACCGCGGCKGCTGGCAC-3').

- *Primers para la qPCR. Applied Biosystems:*

Primer forward 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3',

Primer reverse 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCTT-3'

Sonda universal del gen 16S 5'-FAM/CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC/3'-TAM.

➤ 1.2. MATERIAL INVENTARIABLE Y EQUIPOS

- *NanoDrop*® ND-1000. Spectrophotometer. N° serie: A820
- *MasterLab Pro* (Jaeger, GMBH, Wuerzburg, Germany)
- *Vórtex: Reax top*. N° 541-10000-00-0 AC 230 V. 50 Hz, 51 W, 100-2500 1/min. Serie N°: 1108333011. *Heidolph*
- *Sonicador*. CD 3000512, N° 308483, 50 Hz, 50w. *Ultrasons Selecta*®
- *Reloj avisador digital*. Ref:900400. *Detalab S.L.U.*
- *454 Life Sciences* (Roche®): 06272924001
- *Microcentrífuga: Bifuge*® estratos D-37520. 50-60 Hz, 230 V, 8A. *Heraeus. Kendro*
- *Cabina de bioseguridad*. Tipe KS 12, 1/PEAC. Ref: 51022515. N° serie: 40763984. EN 12469:2000, Clase II, 230V; 50-60 Fz. *Thermo Scientific*
- *Micropipetas de 0,5-10 Microl*. N° serie: 1981304. *Eppendorf research*
- *Micropipetas de 10-100 Microl*. N° serie: 1016224. *Eppendorf research*
- *Micropipetas de 100-1000 Microl*. N° serie: 1040374. *Eppendorf research*
- *Transiluminador TVC 312-A*. Modelo TVC-312A/F 220. 50 Hz. *Spectroline*®
Longlife TM Filter. Spectronics Corporation
- *PCR a tiempo real: Real-Time PCR system 7500*®. N° serie:73001779. High Resolution Melt (HRM) *Software v2.0. Applied Biosystem*
- *Termociclador Power Pac*™ basis. N° serie: 041BR53117. *Bio-rad*

➤ 1.3. MATERIAL FUNGIBLE

- *Mascarilla 3D 243FV FFP3D*. EN 149:2001 *Dach*.
- *Guantes de nitrilo*. Talla pequeña, sin polvo. 10x100 unidades/caja. Ref: 402P. *Detalab S.L.U*

- *Asas Estériles Rígidas 1UL Ref: 8175. Analyzer*
- *Tubos RNase-free Microfuge (1.5 ml) Ref.:AM12400. Life Tech*
- *Tubo plástico estéril 10 ml. Ref: b/100. Detalab S.L.U*
- *Barrier (Filter) Tips, 10, 100, 1000 µl size ref: AM12640/48/65. Life Tech*
- *Parafilm (4 IN x 125 FT. Roll). Durviz*
- *Pipeta pasteur desechable. Ref:13725. Afora S.A.*

➤ 2. MÉTODOS UTILIZADOS

* CAPÍTULO I: SELECCIÓN DE LOS PACIENTES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se reclutaron 19 pacientes consecutivos capaces de expectorar de manera espontánea y que presentaban una clínica pulmonar en fase estable (durante al menos tres meses sin empeoramiento y sin que hubieran recibido antibióticos por cualquier otro motivo). En este caso, los pacientes se dividían en dos grupos de acuerdo con la gravedad de su proceso clínico: 9 pacientes con EPOC leve o moderado y 10 pacientes con EPOC grave o muy grave de acuerdo con los criterios clínicos establecidos en la práctica clínica (tabla 8).

Id	Sexo	Edad (años)	Status fumador	Paquetes/año de fumador	EPOC	CVF(ML)	CVF (%)	VEF1 (ML)	VEF1 (%)	VEF1/CVF (ML)
1	Hombre	84	Actual	80	Moderado	1670	72	1120	67	67
2	Hombre	71	Pasado	30	Grave	2380	70	1060	40	44
3	Hombre	62	Pasado	40	Muy grave	1310	29	680	21	51
4	Hombre	72	Actual	60	Grave	2440	52	1220	36	64
5	Hombre	83	Pasado	75	Grave	1450	52	660	32	45
6	Hombre	73	Actual	55	Muy grave	1780	59	1010	25	57
7	Hombre	64	Pasado	150	Muy grave	1190	37	680	27	56
8	Mujer	74	Actual	40	Grave	1340	57	780	48	58
9	Hombre	66	Pasado	80	Moderado	2920	63	1690	50	58
10	Hombre	63	Actual	30	Moderado	2270	63	1920	73	84
11	Mujer	69	Actual	40	Grave	1520	54	910	46	60
12	Hombre	63	Actual	50	Moderado	3470	94	2240	78	65
13	Hombre	73	Pasado	50	Moderado	2510	62	174	61	69
14	Hombre	67	Actual	80	Muy grave	1550	32	820	23	53
15	Hombre	85	Pasado	62	Moderado	2060	76	1250	64	58
16	Hombre	80	Pasado	55	Moderado	2870	94	1480	65	52
17	Hombre	61	Pasado	50	Moderado	2910	77	1630	55	56
18	Hombre	68	Actual	20	Moderado	3580	68	2410	63	67
19	Hombre	73	Pasado	25	Grave	1820	56	980	40	54

Tabla 8: Características socio-demográficas individuales de los pacientes incluidos en el estudio.

Se excluyeron todos los pacientes con enfermedad cardíaca isquémica presente o recurrente, enfermedad cardíaca congestiva, enfermedad cerebro-vascular, demencia, cáncer de pulmón, enfermedad psiquiátrica conocida, en tratamiento mantenido con corticoides sistémicos (oral o parenteral), tuberculosis activa, síndrome inflamatorio intestinal o diabetes *mellitus* insulino-dependiente. Se llevó a cabo una espirometría, tras administrar un broncodilatador, en pacientes clínicamente estables (*MasterLab Pro, Jaeger, Wiirzburg, Germany*). Se recogieron datos acerca del hábito tabáquico (situación actual, años de tabaquismo y número de paquetes de 20 cigarrillos al día). Los pacientes que habían dejado de fumar al menos 6 meses antes del reclutamiento se consideraron ex-fumadores. El diagnóstico y la clasificación de EPOC se estableció de acuerdo a las recomendaciones GOLD.

En cuanto a la recogida de la muestra de esputo, se debe tener en cuenta que además de microorganismos, contiene una mezcla de componentes entre los que se encuentran células del epitelio respiratorio del huésped, proteínas y otros materiales de secreción producidos en los pulmones como resultado de la respuesta inflamatoria. Para disminuir la contaminación superficial de la muestra con la microbiota que coloniza el tracto respiratorio superior y la cavidad oral, se han recomendado algunas medidas a tomar, como la extracción de la dentadura postiza, si se utiliza, y el enjuague de la boca con agua o solución salina estériles, antes de la recogida de la muestra (Procedimientos en microbiología SEIMC nº 25, 2007).

El esputo obtenido por expectoración espontánea debe ser el resultado de un golpe de tos profunda y contener secreciones purulentas representativas del tracto respiratorio inferior. Deben desecharse los esputos compuestos por saliva o secreciones postnasales (Procedimientos en microbiología SEIMC nº 25, 2007).

Por tanto, se pidió a los pacientes que expectoraran de manera espontánea; un tercio de la muestra de buena calidad se usó para el cultivo bacteriano cuantitativo, otro tercio se empleó para la pirosecuenciación y el tercio restante de la muestra se conservó en un bio-banco.

***CAPÍTULO II: CONSIDERACIONES ÉTICAS DEL ESTUDIO**

A todos los participantes del estudio, de acuerdo a la declaración de Helsinki, se les ofreció un consentimiento informado detallado y específico para las técnicas de obtención de muestras previamente a su inclusión en el estudio. Las muestras se incluyeron en el Biobanco del Hospital General Universitario de Elche. La no participación en el proyecto en ningún caso afectó al acceso a un tratamiento de alta calidad que consistirá en el ofertado de forma habitual en el servicio de

Neumología con independencia de la participación o no en el estudio. El protocolo fue aprobado por los comités de investigación del hospital participante en el estudio.

*CAPITULO III: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ESPUTO PARA EL CULTIVO CUANTITATIVO:

➤1. Fundamento

Los pacientes con EPOC frecuentemente presentan colonización bacteriana en las vías respiratorias bajas, hecho que se asocia con una elevación significativa de los marcadores inflamatorios. El curso de esta enfermedad se caracteriza por presentar exacerbaciones agudas intermitentes de los síntomas. Aproximadamente la mitad de estas exacerbaciones se producen por infección bacteriana, siendo *H. influenzae* el principal patógeno implicado, seguido de lejos por *M. catarrhalis* y *S. pneumoniae*. No obstante, en los últimos años la infección por *P. aeruginosa* empieza a ocupar un papel relevante como marcador de gravedad, asociándose con una intensa inflamación de las vías respiratorias. Aproximadamente el 4% de las exacerbaciones son producidas por este microorganismo, llegando hasta el 8-13% en pacientes con EPOC avanzada. Todavía disponemos de pocos datos acerca de la idiosincrasia de la infección por *Paeruginosa* en pacientes con EPOC, aunque en una importante proporción de los casos parece ajustarse al modelo de colonización-infección crónica con exacerbación aguda extensamente estudiado en los pacientes con fibrosis quística.

Como medios primarios de cultivo para el aislamiento y recuento de bacterias se utilizan placas de agar sangre, agar chocolate y agar *Mac Conkey* o EMB como medio selectivo para bacilos Gram negativos. Además se incluirá agar BCYE para el cultivo de *Legionella spp.*, y agar *Saboureaud* para el cultivo de hongos, preferiblemente en tubo inclinado. Opcionalmente puede utilizarse agar para anaerobios (en muestras de cepillado bronquial y biopsias) (Procedimientos en microbiología SEIMC n° 25, 2007).

Existen dos métodos para la realización de los cultivos cuantitativos: el método de las diluciones en el que se realizan diluciones decimales seriadas de las muestras en suero salino fisiológico y posterior siembra de alícuotas de las diferentes diluciones en los medios de cultivo y el método de la siembra con asa calibrada. Después de la incubación se cuentan las colonias y se multiplican por el factor de dilución apropiado para determinar el número de bacterias presentes (Procedimientos en microbiología SEIMC n° 25, 2007).

En el presente trabajo se utilizó el primer método mencionado, es decir, el de las diluciones seriadas y no añadieron medios para anaerobios, y dado que quería asemejarse al práctica microbiológica habitual, en la cual normalmente no se añaden medios para anaerobios.

➤ 2. Cultivo Cuantitativo: método de las diluciones seriadas

Para el análisis del cultivo cuantitativo, las muestras fueron procesadas en cabina de bioseguridad. Se seleccionó la porción de la muestra más purulento o sanguinolenta y con dicha porción se realizó una extensión sobre un portaobjetos para la tinción *Gram*, solo se seleccionaron aquellas que fueran muestras de buena calidad (según los criterios de Murray y Washington (1975)).

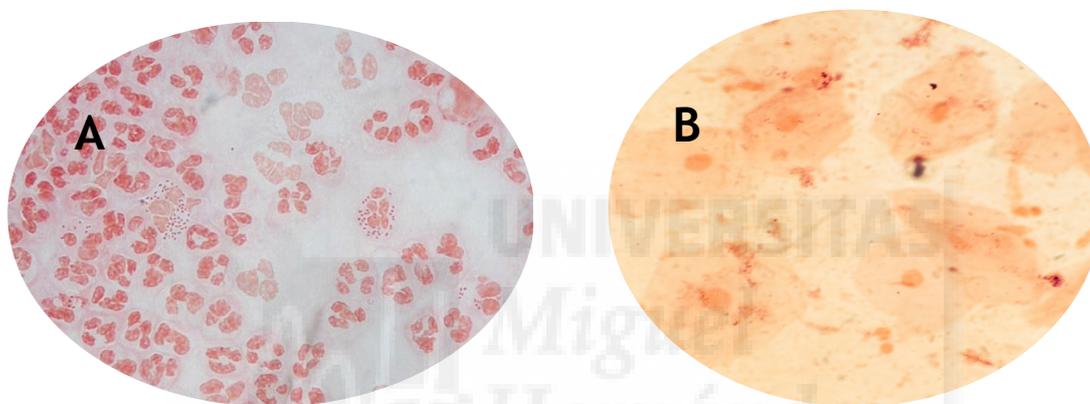


Figura 10: Gram de esputo.

A) > 25 leucocitos/campo de 100X y < 10 células epiteliales escamosas/campo de 100X. **B)** < 25 leucocitos/campo de 100X y >10 células epiteliales escamosas/campo de 100X.

Posteriormente, se añadió un volumen de N-acetil-cisteína equivalente al volumen de la muestra (dilución 1/2: dilución A), y esta primera dilución se incubó a 37° C durante 15 minutos. A continuación, se realizaron diluciones seriadas a partir de la dilución A en tubos *ependorf* de 1,5 ml con suero fisiológico:

- ▶ **Dilución B:** 1/10 (1 ml de suero fisiológico + 100 microlitros A)
- ▶ **Dilución C:** 1/100 (1 ml de suero fisiológico + 100 microlitros B)
- ▶ **Dilución D:** 1/1.000 (1 ml de suero fisiológico + 100 microlitros C)
- ▶ **Dilución E:** 1/10.000 (1 ml de suero fisiológico + 100 microlitros D)

De cada una de estas diluciones se sembró 10 microlitros de cada alícuota de las diferentes diluciones (A-E) y se extendió con asas estériles en los siguientes medios de cultivo por triplicado:

- ▶ Agar Sangre
- ▶ Agar Chocolate
- ▶ Agar *MacConkey*
- ▶ Agar BCYE (Agar Extracto de Levadura Carbón)
- ▶ Agar *Saboreaud*

Una vez sembradas estas placas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 horas. Las placas de BCYE, dado que son para el crecimiento de *Legionella spp.* se incubaron, también en CO₂ pero durante una semana.

La interpretación y recuento fueron una vez observado el crecimiento bacteriano:

- ▶ **Para la dilución A:** el número de colonias por 200
- ▶ **Para la dilución B:** el número de colonias por 2×10^3
- ▶ **Para la dilución C:** el número de colonias por 2×10^4
- ▶ **Para la dilución D:** el número de colonias por 2×10^5
- ▶ **Para la dilución E:** el número de colonias por 2×10^6

Una vez realizado el recuento bacteriano, cada bacteria era aislada en su medio correspondiente (según sus requerimientos nutricionales) para identificarlas mediante secuenciación parcial del gen 16S ARNr previa extracción del ADN mediante método *CHELEX-100*.

Por otro lado se pasó el contenido de la dilución A a un tubo de 25 ml y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante por decantación. El *pellet* obtenido fue el que se utilizó para la aplicación de la pirosecuenciación.

➤ 3. Extracción de ADN mediante método *CHELEX-100*

El método del *CHELEX-100* para la extracción del ADN permite amplificar fragmentos de bajo peso molecular, y es una resina que preferentemente captura iones metálicos polivalentes en soluciones. El efecto de esta sustancia es prevenir a través de su acción quelante la ruptura del ADN a altas temperaturas catalizada por los iones involucrados en las muestras de trabajo (Yasier D´A. y col. 2006).

Metodología para extracción de ADN a partir de una colonia:

Este método de extracción fue el que se utilizó para extraer el ADN de las colonias que se querían identificar por 16S ARNr para su posterior secuenciación Sanger. Para ello, se separó una dilución 1/10 a partir de la resina *CHELEX* con agua estéril, se dispensó 500 microlitros en cada tubo *ependorf* (uno por cada bacteria aislada en la muestra), resuspendiéndose la colonia en la fase acuosa. Se congelaron los tubos a -70°C durante 15 minutos, posteriormente se aplicó calor (90°C) en un bloque térmico otros 15 minutos. Estos dos pasos anteriores se repitieron un total de tres veces. A continuación se centrifugó a 500 rpm durante 10 minutos y se transfirió 100 microlitros del sobrenadante a un tubo estéril. Posteriormente se realizó una PCR para su amplificación.

➤ 4. Amplificación por PCR previa a la secuenciación parcial del 16S ARNr:

Los *primers* que se utilizaron para la amplificación en la secuenciación parcial del 16S ARNr fueron:

- DNA Stab VIDA: 1492-R (Tm 50°C)
- DNA Stab VIDA: 27-F (Tm 50°C)

Las cantidades de los reactivos utilizados en la *Master Mix* para la amplificación previa a la secuenciación se muestran en la tabla 9. Los reactivos utilizados son de *Ecogen* y la *Taq* polimerasa utilizada es la *Ecotaq* de *Bioline*.

Reactivo	Volumen en μL
Agua	40
Buffer polimerasa x10	5
Mgcl ₂ (50mM)	1,5
Primer reverse	1
Primer forward	1
DNTPS 50 Mmol (A, T,G,C)	0,1 μL de cada DNTPs
Taq pol	0,1
DNA	1
Volume final/ tubo	49

Tabla 9: Reactivos utilizados en la PCR previa secuenciación

El programa de PCR utilizado para su síntesis fue dos ciclos uno a 50 durante 2 minutos y otro 94° C; 10 minutos seguidos de 30 ciclos de: 94° C 20 segundos, 50° C 20 segundos, 72° C 3 minutos, y un último paso de 2 ciclos 72°C durante 10 minutos.

➤ 5. Secuenciación parcial del ARNr16s (secuenciación Sanger)

Esta secuenciación se realizaba en la empresa *Secugen* al cual, se enviaba el producto de PCR amplificado y el *primer* 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') Tm 53,2 °C 80,5 nMoles diluido a 100 nMol/ml. La secuenciación empleada por *Secugen* es de tipo Sanger (*BigDye*® *Terminator* v3.1).

Este método de secuenciación de ADN fue diseñado por Sanger, Nicklen y Coulson también en 1977 y se conoce como método de los terminadores de cadena o dideoxi que inicialmente estaban marcados radiactivamente. En la actualidad, esta metodología está automatizada, y la reacción de secuenciación se basa en una modificación de este método, en el cual se usan con dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar (Metzker 2005).

Para este método resulta esencial disponer de un ADN de cadena simple (molde) y un iniciador, cebador o "*primer*" complementario de una región del ADN molde anterior a donde va a iniciarse la secuencia. Este cebador se utiliza como sustrato de la enzima ADN polimerasa I que va a extender la cadena copiando de forma complementaria el molde de ADN.

Se diseña un oligonucleótido sintético de unos 17-20 bases complementario de la cadena de ADN que se quiere secuenciar y situado a unos 20-30 bases de distancia del comienzo de la secuencia que se quiere leer. Si este oligonucleótido se diseña fuera de la región de clonaje de los plásmidos podrá emplearse el mismo oligo para secuenciar distintos insertos.

El dúplex formado entre el oligo y el ADN complementario de cadena sencilla se convierte en sustrato de la ADN polimerasa I que va a extender la cadena desde grupo OH libre del extremo 3' del oligonucleótido, incorporando dNTPs y copiando el molde de ADN al sintetizar la cadena complementaria. Como enzima se emplea el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I que carece de actividad exonucleasa 5'-3'. También pueden emplearse otras polimerasas como la *Taq* polimerasa o la polimerasa del fago T7.

Durante la secuenciación se llevan a cabo cuatro reacciones de síntesis separadas incluyendo en cada una de ellas pequeñas cantidades de los dideoxinucleótidos (ddNTP: ddGTP; ddATP, ddCTP, ddTTP) que carecen de extremo 3' OH libre y que al incorporarse en la cadena de ADN que se está sintetizando acaban con la elongación de la misma, cada dideoxinucleótido va marcado con un fluorocromo diferente (Metzker, 2005).

La incorporación al azar de un ddNTP en competición con el dNTP correspondiente, implica la formación de una mezcla de cadenas de distintas longitudes, todas ellas empezando en el extremo 5' y acabando en todas las diferentes posiciones posibles donde un ddNTP puede incorporarse en lugar de un dNTP. El promedio de longitud de las cadenas puede alterarse modificando la relación dNTP/ddNTP en la mezcla de reacción. Por ejemplo, aumentando la concentración de ddNTP aumenta el número de cadenas de pequeña longitud al aumentar la frecuencia de incorporación de este tipo de nucleótidos (Metzker 2005).

La sustitución de uno de los dNTPs por el mismo nucleótido marcado con fluorescencia emitirá una señal que posteriormente se medirá. Para ello, el *pool* de cadenas sintetizadas se introducen en un secuenciador donde se separan por tamaño mediante electroforesis capilar y los picos de fluorescencia correspondientes a cada nucleótido, llegarán a un detector en tiempo real (láser), y cuyos datos se pueden transformar informáticamente en un cromatograma que nos dará los datos de la secuencia de nuestra muestra de ADN (Metzker 2005).

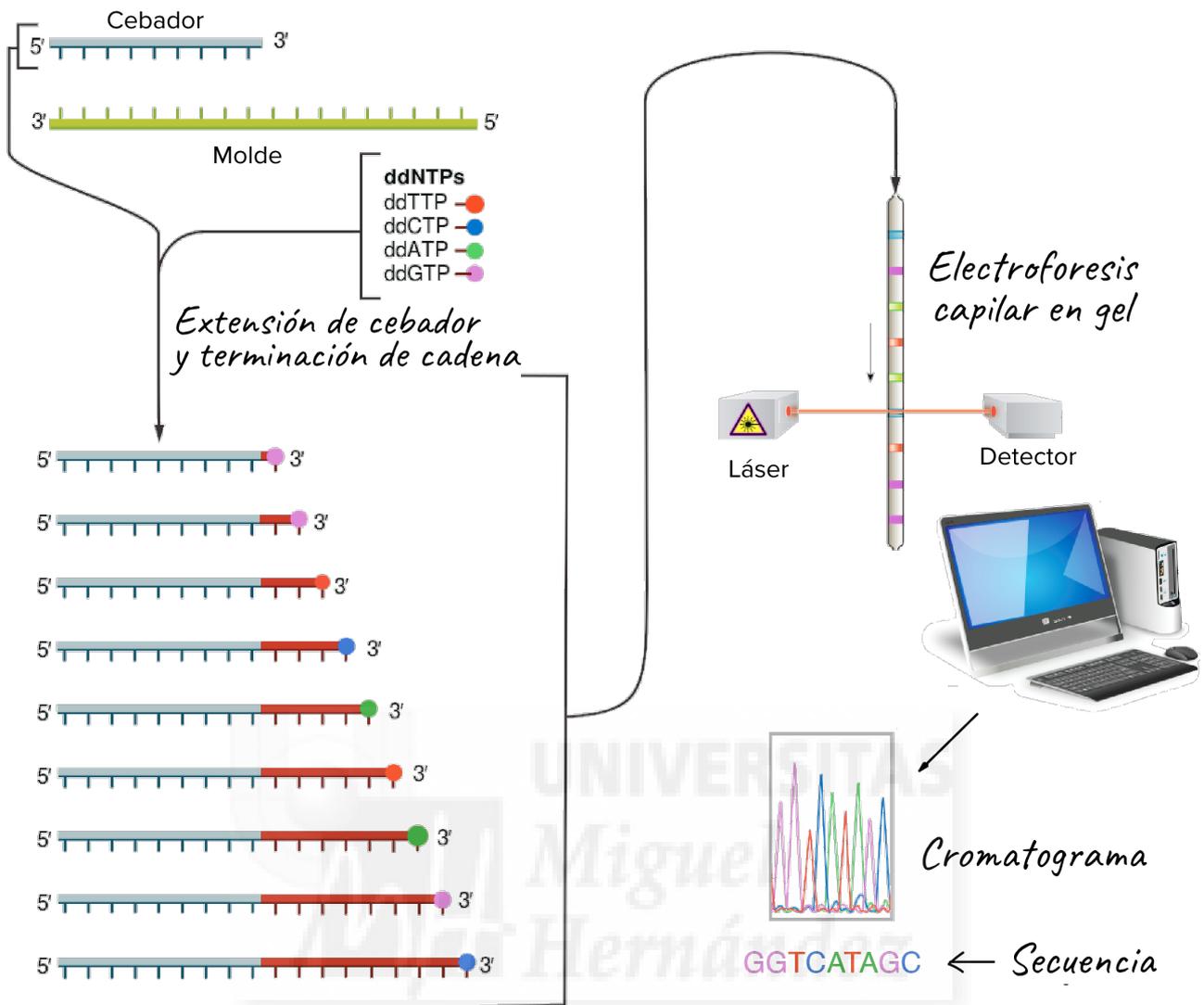


Figura 11: Esquema de la secuenciación Sanger

6. Análisis de las secuencias.

Una vez obtenidos los datos de las secuencias de *Secugen*, a éstas se les hizo un *end-trimming* para eliminar las zonas de mala calidad de dichas secuencias. Las secuencias parciales de los genes 16S ARNr obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos del *Gen Bank* obtenidas del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante la búsqueda avanzada del BLAST en blast.ncbi.nih.gov/blas.cgi, para las secuencias 16S ARNr (dominio *Bacteria* y *Archaea*).

*CAPÍTULO IV: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA PIROSECUENCIACIÓN PARA EL ANÁLISIS METAGENÓMICO

➤1. Fundamento:

La metagenómica consiste en el análisis genómico de las comunidades microbianas. El término deriva del concepto estadístico de meta-análisis (análisis estadísticos de una serie de resultados obtenidos en ensayos clínicos individuales con la finalidad de integrarlos) y del de genómica (estudio del material genético completo en un organismo). La metagenómica ha surgido como una nueva herramienta con gran capacidad de estudiar infecciones asociadas a poblaciones bacterianas complejas, extraordinariamente superior a los métodos microbiológicos clásicos. Esta nueva tecnología de secuenciación masiva permite clasificar la obtención de datos de secuencias de ADN en poco tiempo y coste y solventan los problemas asociados a los métodos clásicos de diagnóstico basados en el cultivo. La más conocida de todas ellas es la técnica de la pirosecuenciación. Mediante esta técnica, tras la realización de miles de reacciones de amplificación y secuenciación en cada muestra, se realiza un análisis metagenómico del gen amplificado (Nakamura y col. 2008, Ansorge 2009).

El gen 16S ARNr, como ya se ha mencionado anteriormente, tiene regiones genéticas altamente conservadas y regiones genéticas variables específicas para cada especie que es lo que dota a este gen de tener capacidad para clasificar filogenéticamente los microorganismos. Así pues, mediante la pirosecuenciación se obtiene una caracterización y cuantificación de los diferentes genes 16S en la muestra, que se traduce en una caracterización y cuantificación de las especies bacterianas (Wang y Qui 2009).

➤2. Extracción de ADN previa la pirosecuenciación

Se utilizaron 300 µl de esputo para obtener el DNA bacteriano presente en la muestra. A los 300 µl de esputo se añadió 100 µl de *buffer* de lisis compuesto por 10 mg/ml de lisozima, 10% de SDS, 10% de CTAB y 25 µl de proteinasa K. A continuación se incubó 1 hora a 37°C y posteriormente 20 minutos a 56°C. La purificación de los ácidos nucleicos se hizo con fenol-cloroformo y precipitación con etanol absoluto. Para ello se añadieron 300 µl de fenol-cloroformo, a continuación se utilizó una centrifuga fría a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se recogió el sobrenadante sin tocar la interfase y se traspasó a otro *eppendorf*, al cual se le añadió 750 µl de isopropanol. A continuación se procedió a la precipitación de ADN mediante la centrifugación a 16.000 rpm durante 20 minutos, una vez centrifugado se eliminó el isopropanol y se adicionó 750 µl etanol 75%, y se volvió a centrifugar a 16.000 rpm durante 10

minutos. Y después se eliminó el etanol y se dejó secar. Una vez seco, se adicionó otros 40 μ L. Después de la extracción se comprobó la calidad de DNA obtenido midiendo con *Nanodrop*, y sólo se procesaron muestras que tenían una *ratio* de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2.

➤ 3. Preparación de la librería de amplicones

➤ 3.1. Amplificación previa a la Pirosecuenciación

Se amplificó una región de un tamaño de 525 bp, comprendida entre la posición 8 y 533 del gen ribosómico 16S. Los *primers* utilizados fueron 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 533R (5'-TTACCGCGGCKGCTGGCAC-3'). Dicha región comprende las regiones de hipervariabilidad génica desde la V1 hasta la V3 del gen ribosómico 16S utilizadas para la clasificación taxonómica de especies bacterianas. A cada muestra se le asignó un único *multiplex identifier* (MID). Para la síntesis de dichos amplicones se utilizó el enzima de alta fidelidad *Extensor Long range PCR Enzime*, y los reactivos usados son de *Thermo Fisher Scientific*.

Reactivo	Volumen en μ L (para 1 muestra)
Agua	40,5
<i>Buffer (high fidelity)</i>	5
<i>Primer reverse</i> 10 pmol (533R)	1
DNTPS 50 pmol (A, T,G,C)	0,1 μ L de cada DNTPs
<i>Taq (high fidelity)</i>	0,1
Volumen final/ tubo	47

Tabla 10: Cantidades de los reactivos utilizados en la *Master Mix* para la amplificación previa a la pirosecuenciación

Una vez pipeteados a cada *epENDORF* de PCR 47 μ L de la *Master Mix*, se añadieron los siguientes reactivos:

- Primer 27F_MID (0,1 μ L)
- ADN de la muestra extraída (2 μ L)

El programa de PCR utilizado para su síntesis fue 94° C 5 minutos seguidos de 30 ciclos de: 94° C 30 segundos, 55° C 30 segundos, 68° C 30 segundos y un último paso de 68° C de 7 minutos.

➤ 3.2. Visualización en gel de agarosa

Después de la amplificación se realizó un gel de agarosa al 2% para visualizar si estaba la banda de interés, para ello se utilizó una bandeja de plástico que se cierra con cinta *Minesota*. Por otro lado, en un vaso de precipitado, se añadieron 800 mg del gel de agarosa de electroforesis y 40 ml de TBE 1x (TRIS, ácido bórico y EDTA). Esta solución se calentó en el microondas hasta su disolución completa. Posteriormente se añadieron 200 μ L de Bromuro de etidio, y se vertió en la bandeja colocándose seguidamente los peines para conseguir los pocillos en el gel. Se dejó enfriar aproximadamente unos 20 minutos. Trascurrido ese tiempo se añadió por cada muestra 3 μ L del marcador de peso molecular *Invitrogen TrackIt™* y 5 μ L de la muestra. Seguidamente se colocó el gel en el aparato de electroforesis y se cargaron los pocillos. Después se procedió a la electroforesis con una corriente (100 mV) durante 35 minutos y se hizo una lectura bajo la luz UV para visualizar si estaba la banda de interés, con un tamaño aproximado de entre 500 y 600 bp.

Para finalizar este paso, se volvió a comprobar la calidad de DNA obtenido midiendo con *Nanodrop*, sólo se procesaron muestras que tenían una *ratio* de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2

➤ 3.3. Pirosecuenciación por el método de 454 Life Sciences (Roche®)

Tras esta amplificación previa del ADN, se procedió a la secuenciación mediante secuenciación masiva, entre las que se encuentra la pirosecuenciación de 454-Roche.

En el presente trabajo, para la pirosecuenciación, se parte de productos de PCR que llevaban incorporados los adaptadores, pues el adaptador A viene incorporado en el primer *forward* y el adaptador B viene incorporado en el primer *reverse*.

Se realizó en un sistema conocido como *Genome Sequencer FLX* y tuvieron lugar los siguientes pasos:

3.3.1. Purificación de producto de la PCR

Posteriormente y previo a la pirosecuenciación, es preciso eliminar impurezas como restos de *primers*, *primers dimers* y fragmentos inferiores a 200-250 pares de bases, para obtener un purificado enriquecido en ADN del tamaño de los amplicones obtenidos previamente. Esto se consiguió mediante una primera purificación del ADN con *Minielute PCR purification Kit* (*Qiagen, USA*), y una segunda purificación mediante el uso de microesferas magnéticas, *AMPure beads* (*Agencourt, USA*), que junto con un reactivo de inmovilización y un imán permitieron la unión eficiente de las cadenas de DNA del tamaño deseado e inferior a 250 pb. Varios pasos de lavado-

elución permitieron la obtención del DNA libre de contaminantes (<http://454.com/products/gs-flx-system>). A continuación se procedió a su pirosecuenciación mediante el *GS FLX de Roche*, con química *Titanium*, usando microesferas tipo Lib-L.

3.3.2. Proceso de amplificación en emulsión (emPCR)

En este punto, tuvo lugar una nueva amplificación del ADN mediante PCR en emulsión. Primero, se obtuvieron fragmentos de ADN libres de cadena simple mediante desnaturalización a altas temperaturas (90-94 ° C) o mediante la adición de un potente agente alcalino como el NaOH. En ambos casos los puentes de hidrógeno entre ambas cadenas son destruidos, permitiendo la separación en cadenas simples. Estos fragmentos se unen a nanoesferas que contienen un gran número de secuencias complementarias del adaptador A. Esta unión está optimizada para que únicamente se una un fragmento por esfera. Una vez unidos los fragmentos a las nanopartículas, éstos se introducen en una emulsión de agua y aceite de forma que cada esfera quede dentro de una gota con todos los reactivos y enzimas necesarios para la PCR. Cada gota es un microreactor que contiene el “mix” de amplificación. Tras aplicar varios ciclos de temperatura como en una PCR convencional, se generan en cada esfera un gran número de secuencias de doble cadena, idénticas y unidas por el adaptador A (Ahmadian 2006, Metzker 2010, <http://454.com/products/gs-flx-system>).

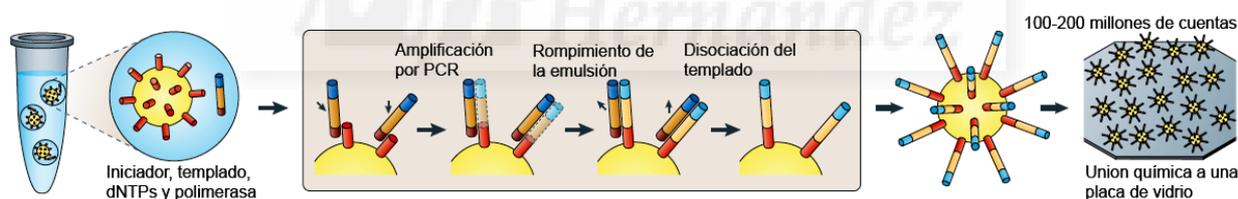


Figura 12: Esquema de la PCR en emulsión en el proceso de pirosecuenciación (Metzker 2010).

A continuación, se rompió la emulsión y se recuperaron únicamente las nanopartículas mediante el uso de filtros específicos y *kits* de lavado. Ahora bien, no todas las nanoesferas empleadas en la PCR de emulsión contienen ADN amplificado. Muchas de ellas están vacías y deben ser eliminadas para no comprometer el último paso en la secuenciación. Por ello, deben seleccionarse únicamente aquellas esferas en las cuales ha habido amplificación. De este modo, se desnaturalizaron los fragmentos de doble cadena nuevamente mediante la adición de NaOH. Acto seguido se incorporaron *primers* biotinizados que se unen a los fragmentos de cadena simple. La selección de estas nanopartículas con ADN biotinizado tiene lugar mediante la adición posterior de la estreptavidina, proteína con propiedades magnéticas y una alta afinidad por la biotina. Con la ayuda de un soporte magnético se facilita la unión de la estreptavidina, la cual, a su vez, está unida con los

fragmentos biotinizados, permitiendo el lavado de las nanoesferas vacías. Por lo tanto, después del proceso general de la PCR en emulsión y las posteriores purificaciones, se obtienen nanopartículas únicas cada una de las cuales posee miles de moléculas idénticas de ADN de cadena simple (Ahmadian 2006, Metzker 2010, <http://454.com/products/gs-flx-system>).

Antes de empezar la secuenciación, se añadieron cebadores complementarios al adaptador B en posición 5', ADN polimerasas y los co-factores necesarios para la síntesis de la cadena complementaria a los fragmentos de ADN de cadena simple unidos en las nanoesferas. Éstas, son dispuestas sobre un dispositivo multipocillo denominado "*PicoTiterPlate*", el cual posee más de un millón de pocillos de 29 µm de diámetro, permitiendo la deposición de una única nanoesfera (20 µm) por cada uno de ellos. Además, sobre cada pocillo se introdujeron capas empaquetadas que contienen las enzimas necesarias para detectar la incorporación de los nucleótidos durante la síntesis de la cadena complementaria. Estas enzimas son la sulfurilasa y la luciferasa (Ahmadian 2006, <http://454.com/products/gs-flx-system>).

3.3.3. Secuenciación masiva de DNA

Los nucleótidos se añadieron de forma secuencial y en un orden conocido. Esta adición origina una cascada enzimática que empieza cuando la polimerasa facilita la incorporación de un nucleótido sobre una cadena libre de ADN, generando una molécula de pirofosfato (PPi). La sulfurilasa convierte este PPi en ATP usando adenosina-fosfo-sulfato. El ATP es hidrolizado por la enzima luciferasa usando luciferina, produciendo oxoluciferina y emitiendo luz, finalizando la cascada enzimática que tiene lugar en el proceso (Ahmadian 2006).

La placa "*PicoTiterPlate*" se introdujo en el secuenciador, el cual automatizó los procesos de secuenciación, captura de imágenes e interpretación de las mismas. El secuenciador vertió automáticamente sobre los pocillos los reactivos necesarios y un tipo de nucleótido cada vez de forma cíclica. En cada pocillo, la ADN polimerasa añadirá uno o más nucleótidos dependiendo de la secuencia que actúa como molde y se emitió luz con una intensidad proporcional al número de nucleótidos incorporados a la nueva cadena que se va sintetizando durante el proceso de secuenciación. La emisión de luz es detectada por una cámara CCD. El secuenciador consta de un sistema óptico especial que recoge el patrón de destellos luminosos que se emiten en el "*PicoTiterPlate*" y un sistema informático que interpreta estos patrones de luz. El proceso se repite de forma cíclica con otro tipo de nucleótidos y con lavados entre cada uno de los ciclos hasta obtener una cadena complementaria a la que actuaba como molde. Después de esto se lava el exceso de nucleótidos y reactivos y se repite el proceso con otro tipo de nucleótido de forma cíclica hasta que finalice la síntesis de una cadena

complementaria a la cadena que actúa como molde. El resultado es la secuenciación de los fragmentos que hay en cada pocillo (Ahmadian 2006).

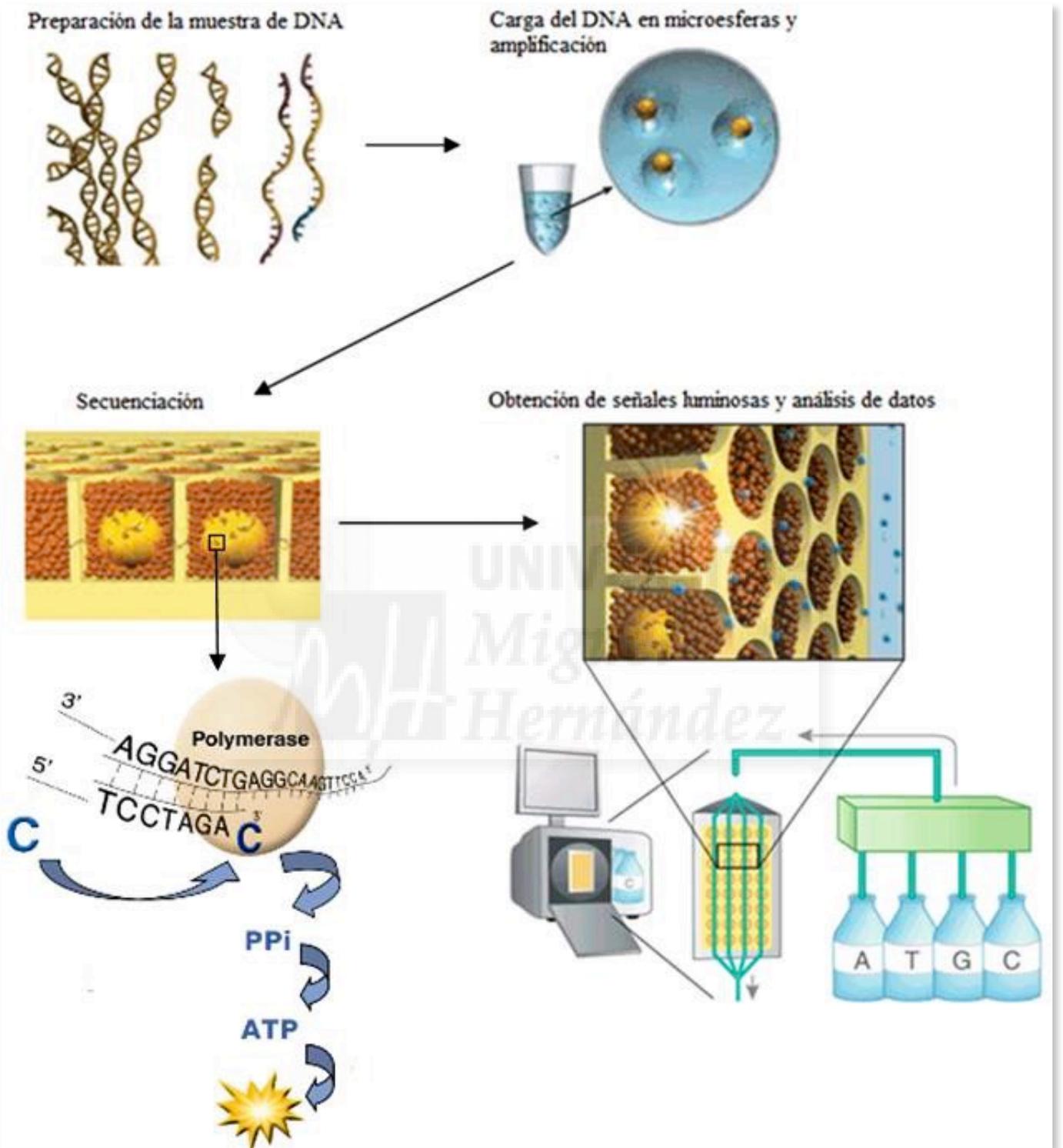


Figura 13:. Esquema de la secuenciación de nueva generación por el método de Roche®.

3.4. Análisis bioinformático y asignación de los OTUs

Los archivos que se obtuvieron del secuenciador presentaban un formato *sff* (*Standard Flowgram Format*), un archivo binario que básicamente contiene toda la información obtenida en las distintas imágenes tomadas por el secuenciador durante la incorporación de los nucleótidos. Las primeras líneas describen información general sobre el funcionamiento de la pirosecuenciación, por ejemplo: el número de flujos luminosos, el orden de los nucleótidos en los flujos, la longitud de la secuencia, una “*key sequence*” que consta de 4 nucleótidos utilizados por el instrumento para calibrar la intensidad de luz tras una sola incorporación de nucleótidos. Además, hay una descripción de cada secuencia del “*run*” que contiene nuestras muestras, presentando información sobre el posicionamiento del pocillo donde se generó la secuencia, su procesamiento, el número total de bases y los filtrados de calidad que se aplican a la secuencia final. Posteriormente se tiene información acerca de las intensidades relativas de cada *Flowgram*, los flujos con una señal positiva, las bases incorporadas y la puntuación de calidad o “*score*” asignados a cada base.

De toda esta información, es necesario obtener para el análisis la cadena de nucleótidos de cada secuencia y los valores de calidad de cada nucleótido. El propio “*software*” de Roche, mediante el programa *sffinfo*, permite obtener los archivos *FASTA* y *QUAL* necesarios para el análisis posterior. En este punto, el análisis puede llevarse a cabo con distintas metodologías y empleando diversos “*pipelines*”. En el presente trabajo se ha llevado a cabo el análisis mediante el uso de base de datos *Ribosomal database Project* (RDP), que ofrece un gran número de herramientas para realizar el análisis de secuencias apropiado.

Las secuencias obtenidas del secuenciador deben ser filtradas por calidad y tamaño para poder llevar a cabo una correcta y eficiente asignación taxonómica. Esto se debe principalmente a dos razones: en primer lugar, los valores de calidad tienden a ser más bajos conforme se llega al final de las secuencias, pues la intensidad de las señales cae gradualmente. Además, la metodología del 454 presenta errores de asignación en regiones homopoliméricas (por ejemplo ACGCTTTTTTTTTTCG), los cuales se generan debido a que la intensidad de la luz no es exactamente lineal conforme se incorporan varios nucleótidos en un solo flujo, y por tanto la señal tiende a saturarse. Así, es difícil que el *software* distinga entre 9 o 10 nucleótidos seguidos. En este trabajo, se utilizó el software *Qiime* v16.0 para filtrar por calidad y tamaño las lecturas de secuencias obtenidas por el Roche 454 GS-FLX titanium (Caporaso y col. 2010).

A continuación, en cada una de las muestras separadas deben eliminarse secuencias quiméricas, las cuales están compuestas por al menos dos secuencias provenientes de dos secuencias parentales distintas. Durante la amplificación por PCR, los amplicones quiméricos pueden surgir debido a que los amplificados no han completado la etapa de extensión, llegando a ser más cortos que los amplicones esperados. Éstos pueden actuar en el siguiente paso como cebadores, siendo amplificados en los pasos subsiguientes y originando una distorsión de los resultados de nuestro estudio. Después de eliminar las secuencias quiméricas en las lecturas obtenidas, sólo se aceptaron para el estudio las secuencias comprendidas entre 250 bp y 500 bp de tamaño además de utilizar sólo los fragmentos de secuencia que superaron una calidad de *end-trimming* mayor de 25 analizada en ventanas de 50 bases.

Finalmente, tras eliminar las quimeras, se realizó un análisis taxonómico de todas las muestras, asignándose cada lectura a un filo, clase, familia y género. Por tanto, para asignar las *Operational Taxonomic Units* (OTU'S) se utilizó la base de datos de RDP (*Ribosomal Database Project*) para el gen 16s ARNr con un *bootstrap cutoff* de 80% y sólo se tuvieron en cuenta aquellos OTU's cuya representación fue mayor al 0.5% del total de las secuencias de cada muestra. Se omitieron para el estudio estadístico las secuencias pertenecientes al género *Streptococcus sp*, ya que se encontraban en la misma proporción en todas las muestras (abundancia relativa del 20-30% de las lecturas totales; dato no mostrado).

Una vez obtenidos todos los asignamientos se analizó si existían diferencias entre los OTUs asignados en cada uno de los grupos de pacientes comparando un grupo contra otro mediante una ANOVA y un G-test.

Además del análisis taxonómico de cada una de las muestras, son numerosos los índices que permiten estimar la riqueza y diversidad bacteriana en una muestra. Para este análisis, las secuencias del 16S ARNr con un umbral de identidad > 97% se consideraron unidades taxonómicas operacionales (OTU), representando este grupo de lecturas la aproximación consenso para la misma especie (Sogin y col. 2006). En el presente trabajo, se analizó el índice de Shannon como medida de la α -diversidad bacteriana en cada muestra, junto con curvas de refracción.

Las curvas de refracción calculan el número esperado de especies de cada muestra si todas las muestras fueran reducidas a un tamaño estándar, es decir, reduce el tamaño de la muestra mayor para equipararla con la muestra menor (Moreno y Haffner 2001).

El índice de Shannon es un índice de información estadístico que asume que todas las especies están representadas en una muestra randomizada. En el índice de Shannon, p representa la proporción (n / N) de individuos de una especie en particular encontrada (n) dividido por el número total de individuos que se encuentran (N), \ln es el logaritmo natural, Σ representa el sumatorio de los cálculos, y s es el número de especies. Cuando toda la abundancia se concentra a una especie, y los otros son muy raros (aunque haya muchos de ellos), el índice de Shannon se aproxima a cero (<http://www.mothur.org/wiki/>).

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \cdot \ln P_i$$

Para el análisis de los *cluster* se utilizó el programa bioinformático R *Heat map* empleando el paquete *Vegan* y *Heatmap plus* (<http://R-project.org>). Este mapa muestra las muestras agrupadas por similitud en función de su composición bacteriana.

Finalmente, los análisis de coordenadas principales (PCoA) para todas las muestras por individuo se realizó con *QIIME* que lleva incorporado el paquete de *UniFrac* una base de datos que proporciona numerosas herramientas para el estudio de comunidades microbianas utilizando información filogenética. Mediante el PCoA se logra retener el conjunto de datos que contribuyen más a la varianza y se consigue una agrupación en un 97% de identidad de las secuencias, comparando la diversidad estimada con un enfoque filogenético, teniendo en cuenta tanto las lecturas asignadas taxonómicamente, como las no asignadas (Lozupone y col. 2006). En este trabajo, se hizo este análisis para la obtención de los parámetros de β -diversidad (análisis de coordenadas principales PCoA).

➤ 4. Determinación de la carga bacteriana total

La qPCR cuantitativa en tiempo real permite amplificar, detectar y cuantificar el ácido nucleico, teniendo como fundamento la técnica de la PCR. Permite hacer seguimiento de la reacción ciclo a ciclo, a medida que se van formando nuevas cadenas del fragmento amplificado observando esta reacción. En la PCR en tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, por un instrumento que combina las capacidades de un termociclador y de detección de fluorescencia. Esta detección por fluorescencia se puede medir

durante la amplificación, ya que la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN formado en cada ciclo de amplificación. Esto permite evaluar y registrar en todo momento la cinética exponencial de la reacción de amplificación (OIE, 2008).

La qPCR puede dividirse en tres fases: la de crecimiento primario, la exponencial y la de finalización. Por tanto, mediante la representación de la fluorescencia frente al número de ciclo en la que se ha detectado, se genera una gráfica que representa la acumulación de producto a lo largo de la reacción de amplificación (figura 14). La fluorescencia evaluada es la que se produce durante la fase de crecimiento exponencial temprana y el ciclo de PCR en el que se produce es denominado Ct (*Curve threshold*) o CP (*Crossing point*). Este valor está relacionado con el número de copias blanco que posee la muestra que se está evaluando, lo cual permite que a través de la PCR en tiempo real se realice cuantificación con una alta sensibilidad y especificidad. Esta reacción no necesita realizar ninguna acción adicional como elaboración, tinción y visualización de geles (Kramer, 2001).

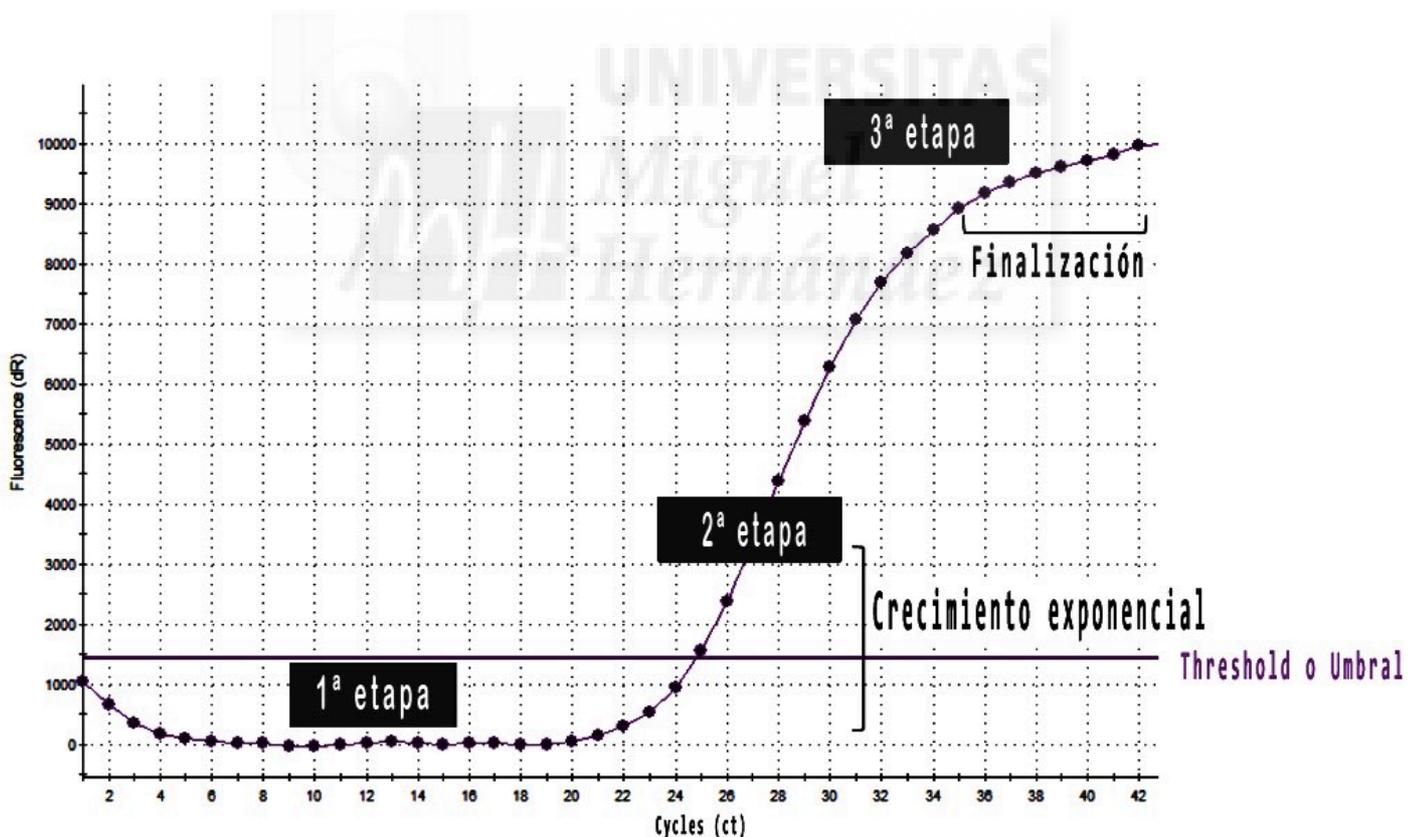


Figura 14: Representación de la fluorescencia frente al número de ciclo en la que se ha detectado.

Las moléculas encargadas de emitir la fluorescencia más empleadas son las moléculas de *SYBR Green* o las sondas *TaqMan*. El reactivo *SYBR Green* detecta ADN bicatenario al intercalarse entre

la doble hélice lo cual la especificidad del mismo no es muy alta ya que se une a cualquier hebra de doble cadena presente en la reacción sin tener en cuenta la secuencia nucleotídica.

Las sondas *TaqMan* permiten aumentar la especificidad mediante el empleo de sondas internas que se unen específicamente a la secuencia. Estas sondas se encuentran marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo y en el extremo 3' con un grupo capaz de absorber la fluorescencia emitida por el fluoróforo, que recibe el nombre en inglés de *quencher*. En aquellos ensayos donde se emplean este tipo de sondas, la secuencia de ADN de interés y la sonda, que es complementaria, hibridan entre sí. Cuando la polimerasa comienza a copiar la hebra molde desde el extremo 3' del cebador, la sonda es degradada por su actividad 5' exonucleasa haciendo que el fluoróforo y el *quencher* se separen produciendo un incremento en la fluorescencia (Lederman 2008; Hugg y col. 2005).

La ventaja de las sondas *Taqman* sobre *SYBR Green* es que la hibridación específica entre la secuencia diana y la sonda es la que genera la señal de fluorescencia (Arikawa y col. 2008). Con el empleo de las sondas fluorescentes, la amplificación de productos no específicos por la unión de los cebadores a secuencias no diana, o por la producción de dímeros de cebadores, no genera señal. Además, estas sondas pueden marcarse con diferentes fluorocromos "*reporter*" en el extremo 5', que se distinguen entre sí porque difieren en sus longitudes de onda de emisión máxima. El empleo simultáneo de sondas marcadas con diferentes "*reporters*" permite detectar la amplificación de dos o más secuencias diferentes en una misma reacción de PCR, pero puede provocar algún error a la hora de determinar la contribución de cada fluorocromo en la reacción. El error es mayor cuanto más se superpone la resolución espectral de los fluorocromos. Así, para una cuantificación exacta usando dos sondas marcadas en un mismo tubo hay que usar los fluorocromos que tienen mayor diferencia en la emisión máxima: 6-FAM TM y JOE TM o VIC TM. Los fluorocromos más comunes son: 6-FAM TM (6-carboxy-fluorescein), VIC TM, TET TM (6-carboxy-tetrachloro-fluorescein), JOE TM (2,7-dimethoxy-4,5-dichloro,6-carboxy-fluorescein) y HEX TM (hexachloro-6-carboxy-fluorescein). En el extremo 3', se suele utilizar TAMRA TM (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) como "*quencher*".

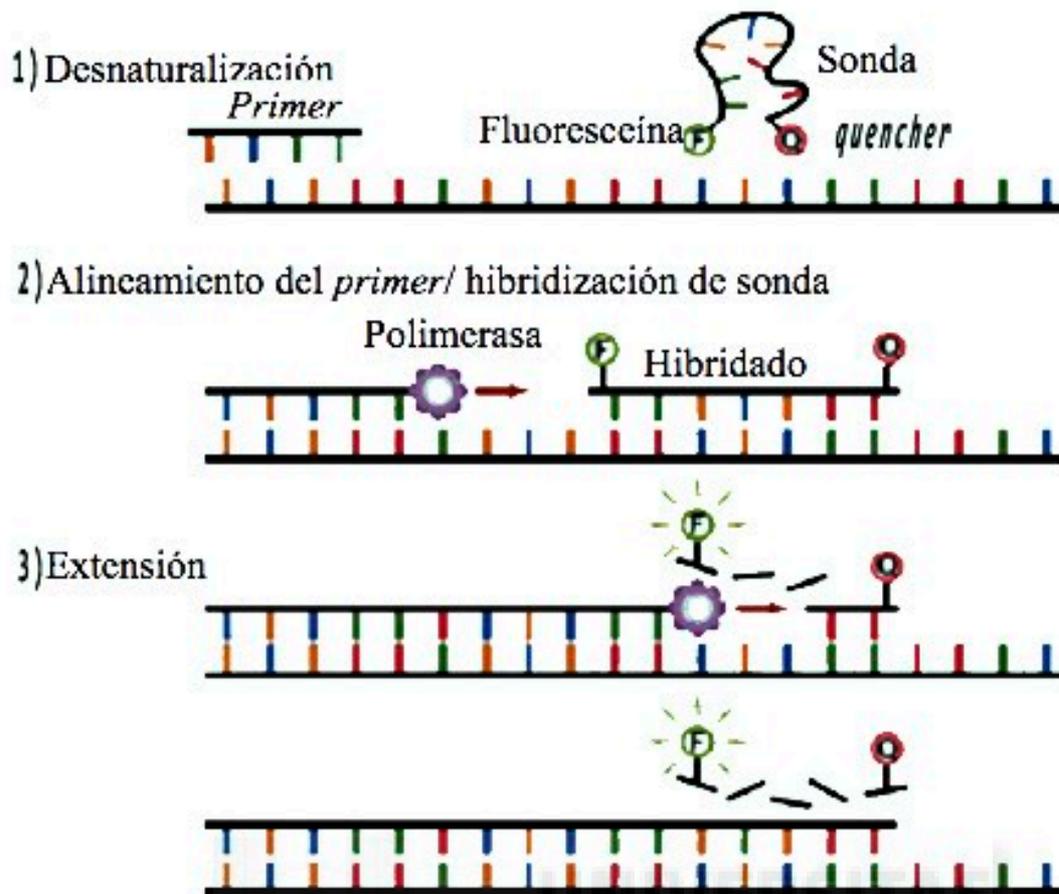


Figura 15: Representación esquemática de un ensayo de RT-PCR usando el método Taqman®

Se utilizó qPCR para cuantificar la cantidad de genes 16S presentes en nuestras muestras. Se utilizó 1 μ L de la muestra problema a una concentración de 50 nanogramos. La cuantificación se hizo con un termociclador “*applied biosystems 7500*” siguiendo el protocolo de 50°C 2 minutos, 95°C 10 minutos seguido por 45 ciclos de 95 °C 15 segundos y 60°C 60 segundos, midiendo la fluorescencia en este último paso. Los *primers* y sonda utilizados fueron un *primer forward* 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3', un *primer reverse* 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCTT-3' y una sonda universal del gen 16S 5'-FAM/CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC/3'-TAM. La curva estándar con la que se correlacionaron los Ct's obtenidos para calcular el número de copias del gen 16S presentes en la muestra se hizo con 7 puntos diluidos 1/10 uno de otro empezando a una concentración de $1.6 \cdot 10^9$ copias del gen 16 S ARNr de *Escherichia coli* K12. Los resultados obtenidos con el fin de poderlos comparar entre sí, se normalizaron con el número de células humanas presentes en la muestra calculadas a partir de la cuantificación de las mismas por qPCR utilizando el gen de la albúmina humana como indicador de presencia de células humanas (Douek y col. 2002).



1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES:

Las características individuales de los 19 pacientes se muestran en la tabla 11. De estos pacientes hay nueve de ellos (48%) clasificados con un estadio moderado y otros diez pacientes (52%) con estadio grave. De ellos, 17 fueron hombres y 2 mujeres con una edad media de 71 años (DE 7,5). Nueve pacientes eran fumadores de manera frecuente y diez lo fueron en el pasado, con un historial de fumador de 50,5 paquetes /año (DE 20,7).

Características	Media (DE*) Leve-moderado	Media (DE*) Graves-Muy graves
Número mujeres/hombres	0/9	2/8
Edad (años)	71(9)	71(6)
VEF1, L	1,82 (0,57)	0,88(0,18)
VEF ₁ (%)	64,00 (8,47)	33,80(9,65)
CVF, L	2,69 (0,63)	1,70(0,43)
CVF (%)	76,22 (11,77)	50,00(12,38)
VEF ₁ /CVF %	62,11 (6,13)	54,20(6,28)
Fumadores, frecuentes/ pasados, n	4/9	5/10
Historial fumador (paquetes/ año)	50,5 (20,7)	50,5 (20,7)

Tabla 11: Características clínicas de base de los pacientes.

DE: desviación estándar .**VEF₁:** Volumen Espiratorio Máximo de aire espirado en el primer segundo. **CVF:** Capacidad Vital Forzada

2. ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA. COMPARACIÓN DE LOS DOS MÉTODOS: CULTIVO CUANTITATIVO Y PIROSECUENCIACION

A continuación se muestra una tabla (12 a y b) en la que se refleja los principales géneros aislados por cultivo convencional y su recuento cuantitativo (UFC/ml esputo) en función de la severidad de la EPOC (leves-moderados y graves-muy graves):

Género	2S	3S	4S	6S	7S	8S	9S	12S	15S	20S
<i>Actinomices</i>	6E+06	–	–	–	–	1E+08	2E+08	1E+09	–	–
<i>Bifidobacterium</i>	–	–	–	–	–	–	2E+07	–	–	–
<i>Corynebacterium</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1E+11
<i>Rothia</i>	4E+05	–	1E+09	–	–	8E+07	–	8E+08	–	–
<i>Tsakamorella</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	4E+06	–
<i>Gemella</i>	–	–	–	–	2E+09	–	–	–	2E+07	–
<i>Granullicatella</i>	–	–	–	–	–	–	–	3E+09	–	–
<i>Lactobacillus</i>	6E+07	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Streptococcus</i>	4E+09	2E+09	1E+10	5E+10	6E+09	2E+07	1E+10	1E+10	4E+06	1E+10
<i>Acromobacter</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2E+10
<i>Acinetobacter</i>	–	–	4E+06	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterobacter</i>	–	–	–	–	2E+06	–	–	–	–	–
<i>Haemophilus</i>	–	7E+08	–	2E+10	–	–	–	–	5E+07	–
<i>Klebsiella</i>	–	–	–	–	5E+06	–	–	–	–	–
<i>Moraxella</i>	–	–	–	2E+10	–	–	–	–	–	–
<i>Morganella</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Neisseria</i>	–	5E+06	1E+10	1E+10	8E+05	–	2E+08	–	–	–
<i>Proteus</i>	–	–	–	4E+04	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i>	–	–	–	–	–	1E+10	–	–	–	–
<i>Serratia</i>	–	2E+07	–	–	8E+04	–	–	–	4E+06	–

Tabla 12 a: Géneros obtenidos en cultivo cuantitativo (UFC/ml esputo) desglosados individualmente por paciente en estadio moderado (Graves-muy graves)

Género	1M	10M	11M	13M	14M	16M	17M	18M	19M
<i>Actynomices</i>	–	8E+06	8E+08	4E+07	–	–	–	6E+07	2E+09
<i>Bifidobacterium</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Corynebacterium</i>	1E+08	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Rothia</i>	1E+07	8E+06	3E+06	–	–	6E+09	–	–	4E+08
<i>Tsakamorella</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Gemella</i>	–	8E+06	–	–	–	–	–	–	–
<i>Granullicatella</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Lactobacillus</i>	–	2E+06	–	–	–	–	–	–	–
<i>Streptococcus</i>	1E+05	1E+08	3E+09	5E+08	9E+08	4E+10	3E+10	2E+09	1E+10
<i>Acromobacter</i>	–	–	–	–	–	–	–	2E+09	–
<i>Acinetobacter</i>	1E+05	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterobacter</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Haemophilus</i>	–	–	–	–	8E+07	1E+10	1E+11	–	–
<i>Klebsiella</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Moraxella</i>	–	–	–	–	5E+08	–	–	–	–
<i>Morganella</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	4E+04
<i>Neisseria</i>	6E+06	–	1E+09	4E+07	2E+08	1E+10	3E+06	–	–
<i>Proteus</i>	4.E+04	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i>	1E+05	–	2E+05	–	–	–	6E+06	–	–
<i>Serratia</i>	–	–	1E+05	–	–	–	–	–	–

Tabla 12b: Géneros obtenidos en cultivo cuantitativo (UFC/ml esputo) desglosados individualmente por paciente en estadio moderado (leves-moderados)

Con el cultivo convencional de las muestras de esputo, se aislaron e identificaron 3 filos y 20 géneros de bacterias, mientras que con la utilización de técnicas de pirosecuenciación se identificaron 9 filos y 43 géneros ($p < 0,001$). En promedio, el número de géneros obtenidos por cultivo fue de 4,3 (DE 1) mientras que el promedio por pirosecuenciación fue de 19 (DE 8,0) con un p valor $< 0,001$. Después de la asignación taxonómica de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación (usando clasificador *RDP*), el filo más representativo fue *Firmicutes* y *Proteobacteria* ya que estuvieron presentes en 19/19 muestras, seguidos de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacterias* presentes en 18/19, 16/19 y 15/19 muestras, respectivamente (Tabla 13). Los filos como *TM7*, *Tenericutes*, *Spirochaetes* y *Synergistetes* se encontraron en menos de 10/19 muestras. Los miembros pertenecientes a los géneros de *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Rothia*, *Veillonella*, *Porphyromonas* y *Haemophilus* fueron, individualmente, los géneros identificados más frecuentemente en las muestras de esputos. Otros miembros como *Haemophilus*, *Pseudomonas* o *Corynebacterium* fueron los géneros predominantes en las muestras 15S y 17M; 8S y 20S respectivamente. El género *Actinomyces* se encontró en 8/9 de las muestras del grupo moderado, mientras que en las muestras de los pacientes más severos solo se encontraron en 2/10 ($p < 0.01$). La distribución de géneros en las diferentes muestras de pacientes se pueden observar en la figura 16.

FILOS	N (%)	Cultivo convencional	N (%)	Pirosecuenciación
<i>Firmicutes</i>	19 (100%)	49 (38)	19 (100%)	58 (29)
<i>Proteobacterium</i>	17 (85%)	47 (38)	19 (100%)	21 (31)
<i>Actinobacteria</i>	14 (70%)	17 (29)	18(95%)	9 (21)
<i>Bacteroidetes</i>	-	-	16 (85%)	7 (5)
<i>Fusobacterias</i>	-	-	15 (79%)	6 (4)

Tabla 13 : Principales filos hallados con cultivo convencional y con pirosecuenciación.

Número de pacientes en los que se identifica el filo y promedio (DE) del porcentaje de cada filo respecto al total de población de los casos en que se aísla. *Bacteroidetes* son anaerobios que no se detectan en cultivo convencional. Las diferencias no tienen significación estadística.

El análisis cuantitativo del cultivo de las muestras mostró la presencia de 10^8 a 10^{11} UFC de los microorganismos que son cultivables. La identificación fenotípica y secuenciación por el gen 16S ARNr mostraron una mayor representación del filo *Proteobacteria* con 11 géneros diferentes y menor representación del filo *Firmicutes* con 4 géneros, aunque cabe destacar que el género

Streptococcus estuvo presente en todas las muestras. Los géneros *Streptococcus* y *Neisseria* fueron los géneros más frecuentes ya que se encontraron en 19/19 muestras y 11/19 muestras, respectivamente, seguidos de *Actinomyces* y *Rothia* encontrados en 9/19. Otros géneros de importancia fueron *Haemophilus* (muestra 17M), *Pseudomonas* (muestra 8S) y *Corynebacterium* (muestra 20S). Estos datos se muestran en la tabla 12 a y b.

Cuando se compararon la dos metodologías, se encontró que el género *Actinomyces* o *Rothia* se identificaron más frecuentemente por métodos de pirosecuenciación. La dificultad de cultivar géneros como *Treponema*, *Mycoplasma*, *Eikenella*, *Kingella* o *Capnocytophaga*, no permitió la identificación a través del cultivo pero si por técnicas como la pirosecuenciación. Además los géneros anaerobios, especialmente los estrictos, como *Veillonella*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Pascardovia* y *Bulleidia* solo pudieron identificarse mediante pirosecuenciación, esto a su vez es debido a que los métodos del cultivo se hicieron de acuerdo a los protocolos estándar de microbiología, en los cuáles normalmente no se incluyen medios para anaerobios para esta muestra. Por otra parte, *Enterobacteriaceae* y *Acinetobacter* fueron aislados en nueve y dos pacientes respectivamente por cultivo convencional, mientras que *Enterobacteriaceae* se identificó sólo en uno de estos once pacientes mediante pirosecuenciación. *Acinetobacter* no se identificó en ningún paciente por el método de pirosecuenciación. En un paciente, la carga estandarizada de *Enterobacteriaceae* por cultivo fue del 4,8%, siendo la única muestra en la que se identificó esta familia por pirosecuenciación. En los restantes 8 pacientes la carga *Enterobacteriaceae* específica fue muy baja ($\leq 1\%$ de la carga bacteriana total en cada paciente) y no fueron identificados por pirosecuenciación. La carga de *Acinetobacter* específica también fue muy baja por cultivo para los dos pacientes y tampoco se detectó por pirosecuenciación (tabla 14).

Género	N	Cultivo convencional	N	Pirosecuenciación
<i>Streptocococaceae</i>	19 (100%)	44 (35)	19 (100%)	45 (25)
<i>Neisseriaceae</i>	11 (58%)	8 (12)	12 (63%)	4 (6)
<i>Actynomices*</i>	9 (47%)	15 (32)	17 (90%)	2 (2)
<i>Haemophilus**</i>	7 (37%)	51 (39)	15 (79%)	15 (30)
<i>Pseudomonas</i>	4 (21%)	25 (49)	4 (21%)	23 (45)
<i>Enterobacterias*</i>	9 (47%)	12 (31)	1 (5%)	<1
<i>Acinetobacter</i>	2 (16%)	15 (32)	0	
<i>Moraxella</i>	3 (16%)	33 (36)	5 (26%)	7 (14)
<i>Rothia***</i>	9 (47%)	6 (7)	16 (84%)	2 (2)
<i>Anaerobios totales</i>			19 (100%)	15 (7)
<i>Campylobacter</i>			13 (68%)	<1
<i>Capnocytophaga</i>			13 (68%)	<1
<i>Corynebacterium</i>			9 (47%)	10 (29)
<i>Gemella</i>			19 (100%)	5 (4)
<i>Atopobium</i>			14 (73%)	<1
<i>Fusobacterium</i>			16 (84%)	4 (5)
<i>Granulicatella</i>			18 (95%)	7 (7)
<i>Leptotrichia</i>			14 (73%)	15 (30)
<i>Mogibacterium</i>			5 (26%)	<1
<i>Micoplasma</i>			3 (16%)	<1
<i>Oribacterium</i>			9 (47%)	<1
<i>Parvimonas</i>			9 (47%)	1 (1)
<i>Porphyromonas</i>			17 (90%)	2 (2)
<i>Prevotella</i>			18 (95%)	4 (4)
<i>Solobacterium</i>			7 (37%)	<1
<i>TM7</i>			11 (58%)	<1
<i>Veillonella</i>			17 (90%)	1 (2)

Tabla 14: Principales géneros con cultivo convencional y con pirosecuenciación.

Número de pacientes en los que se identifica el género y promedio (SD) del porcentaje de cada género respecto al total de población de los casos en que se aísla. Diferencias significativas en frecuencia: *p=0,001;

p=0,01; *p=0,02.

GÉNERO	CUANTITATIVO				PIROSECUENCIACIÓN			
	LEVES- MODERADOS		GRAVES- MUY GRAVES		LEVES-MODERADOS		GRAVES-MUY GRAVES	
	% MO	Nº PACIENTES	% MO	Nº PACIENTES	% MO	Nº PACIENTES	%MO	Nº PACIENTES
<i>Actinomyces</i>	4,33	5/9	1,01	4/10	3,21	8/9	1,18	2/10
<i>Atopobium</i>	0	0/9	0	0/10	0,42	6/9	0,2	9/10
<i>Campylobacter</i>	0	0/9	0	0/10	0,13	6/9	0,36	7/10
<i>Capnocytophaga</i>	0	0/9	0	0/10	14,56	5/9	11,33	7/10
<i>Corynebacterium</i>	8,83	1/9	0	0/10	0,91	5/9	8,89	6/10
<i>Gemella</i>	1,87	1/9	3,64	2/10	5,8	8/9	2,94	11/10
<i>Granulicatela</i>	0	0/0	1,68	1/10	5,41	8/9	7,26	10/10
<i>Haemophilus</i>	19,41	3/9	15,01	4/10	10,8	8/9	12,24	8/10
<i>Leptotrichia</i>	0	0/9	0	0/10	0,56	6/9	0,93	8/10
<i>Mogibacterium</i>	0	0/9	0	0/10	0,14	5/9	0,12	4/10
<i>Moraxella</i>	3,38	1/9	0,64	1/10	3,67	3/9	0,22	2/10
<i>Mycoplasma</i>	0	0/9	0	0/10	0,2	1/9	0,14	02/10
<i>Neisseria</i>	42,22	5/9	5,43	6/10	1,61	7/9	2,97	5/10
<i>Oribacterium</i>	0	0/9	0	0/10	0,12	4/9	0,11	5/10
<i>Parvimonas</i>	0	0/9	0	0/10	0,76	4/9	0,32	5/10
<i>Porphyromonas</i>	0	0/9	0	0/10	2,03	8/9	1,8	9/10
<i>Prevotella</i>	0	0/9	0	0/10	3,62	8/9	4,21	10/10
<i>Pseudomonas</i>	0,12	3/9	8,96	1/10	0,001	1/9	8,21	3/10
<i>Rothia</i>	2,02	5/9	0,95	04/10	1,8	8/9	1,65	8/10
<i>Solobacterium</i>	0	0/9	0	0/10	0,11	4/9	0,05	3/10
<i>Streptococo</i>	57,98	9/9	52,83	10/10	50,79	9/9	40,61	10/10
<i>TM7_género</i>	0	0/9	0	0/10	0,49	7/9	0,25	4/10
<i>Veillonella</i>	0	0/9	0	0/10	1,17	6/9	0,86	9/10
<i>Fusobacterium</i>	0	0/9	0	0/10	3,67	8/9	3,23	8/10
<i>Acinetobacter</i>	0,1	1/9	1,24	1/10	0	0/9	0	0/10
<i>Enterobacterias</i>	0,8	3/9	1,74	6/10	0	0/9	0,01	1/10

Tabla 15: Distribución de géneros en recuento porcentual y en nº de pacientes, comparando los dos grupos establecidos de estado de EPOC, pacientes moderados y graves-muy graves.

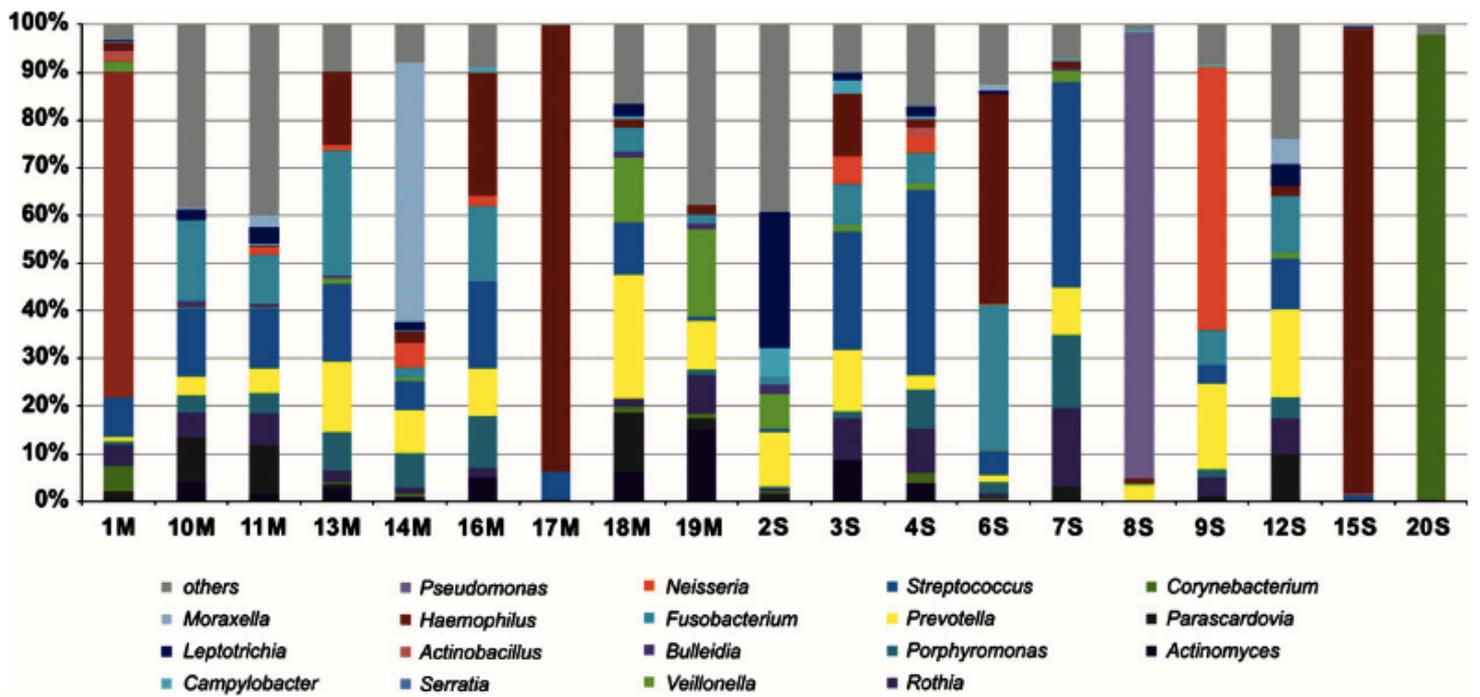


Figura 16: Composición relativa de los géneros en moderados (M) y severos (S) en los pacientes con EPOC



3. MICROBIOTA EN ESPUTO EN PACIENTES CON EPOC MODERADOS FRENTE A SEVEROS: ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD: ALFA -DIVERSIDAD Y BETA-DIVERSIDAD

Posteriormente, para el análisis de la diversidad, se eliminaron unas 8.000 secuencias, obtenidas por la pirosecuenciación, pertenecientes al género *Streptococcus* y que suponen casi el 30% de lecturas del total de las mismas, ya que eran igual de abundantes en todas las muestras. Así, se obtuvieron 12,893 lecturas de secuencias totales, perteneciendo 6,385 secuencias al grupo de pacientes graves-muy graves y 6,508 secuencias al grupo de pacientes leves-moderados. Se analizaron una media de 638 secuencias por muestra en el grupo de los pacientes graves-muy graves y de 723 secuencias por muestra en el grupo de los pacientes leves-moderados. Las secuencias fueron comparadas con la base de datos RDP para su clasificación taxonómica con un punto de corte del 80% y el filo más abundante encontrado en las muestras fue *Firmicutes*, seguido por *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*; aunque en las muestras 17M, 15S y 8S encontramos una acentuada predominancia del filo *Proteobacteria* representado por el género *Haemophilus* en las muestras 17M y 15S y por el género *Pseudomonas* en la muestra 8S (figura 17y 19).

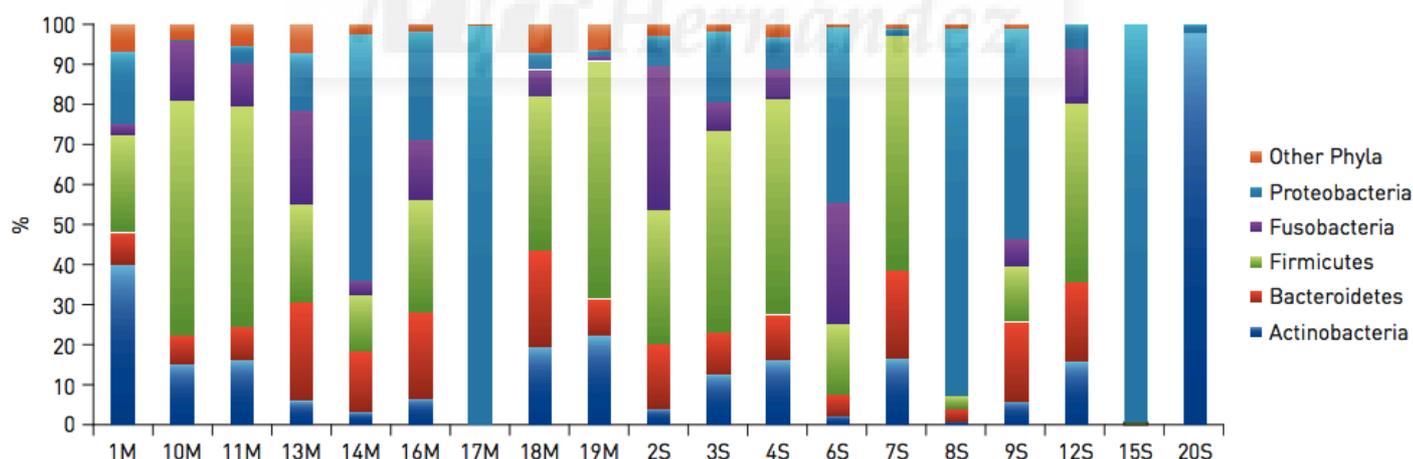


Figura 17: Composición bacteriana a nivel de filo en pacientes con EPOC moderada y grave.

El gráfico de barras muestra la clasificación a nivel de filo de 16S rDNA de secuencias identificadas con al menos 80% de *bootstrap* en el esputo de pacientes con EPOC. 1M a 19M muestras pertenecen a pacientes con EPOC moderada y 2S a 20S pertenecen a pacientes con EPOC grave.

En los análisis de α -diversidad al comparar ambos grupos de pacientes a nivel de género, se observa que los que padecen un proceso leve-moderado presentan mayor biodiversidad bacteriana en sus mucosas respiratorias. Esto se reflejó en un mayor índice de diversidad de Shannon (4,5 en una media de 13 géneros por muestra) que si lo comparamos con los que padecen un proceso grave-muy grave (en los que el índice de Shannon es de 3,1 en una media de 7 géneros por muestra). La diferencia entre los índices de Shannon fue estadísticamente significativa (Shannon $p < 0,05$; test de U Mann-Whitney), indicando en los pacientes graves-muy graves una dominancia de ciertos microorganismos. Además, el grupo de pacientes graves-muy graves presentaba una carga bacteriana superior respecto al grupo de pacientes leves-moderados (5,900 vs 4,200 16S rRNA n° copias gen / células humanas) (figura 18).

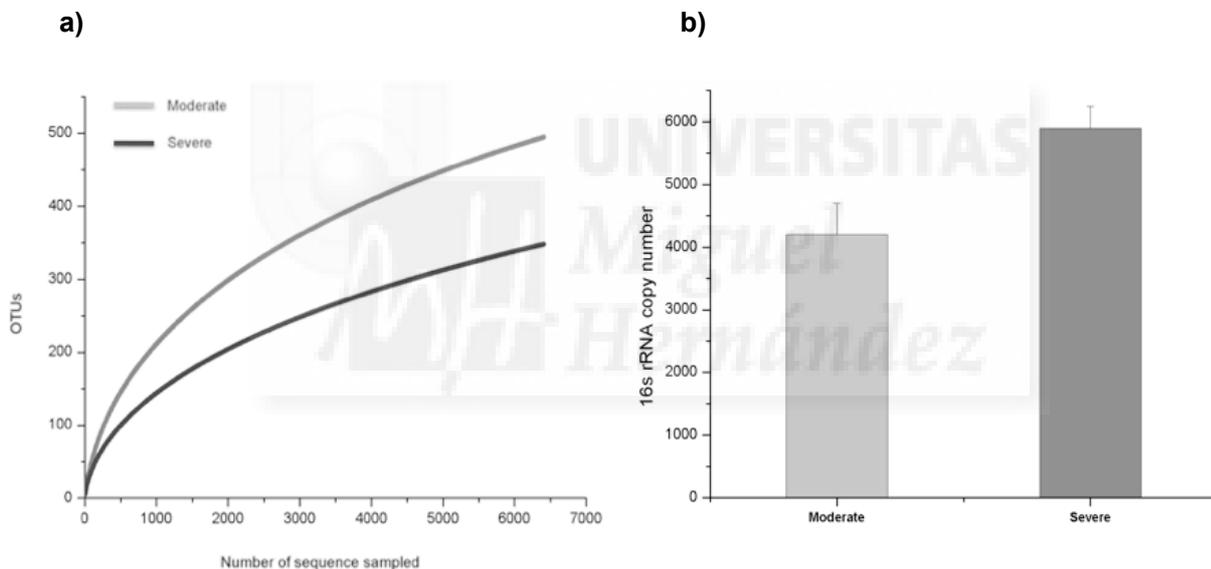


Figura 18: Curvas de rarefacción y carga bacteriana para todas las muestras, agrupadas en las categorías moderada y grave.

A) Análisis de la diversidad α a partir de resultados de pirosecuenciación. Las curvas de rarefacción en el 97% muestran una mayor diversidad bacteriana en el esputo de las muestras de pacientes con EPOC moderada que en las muestras de esputo de EPOC grave. **B)** Carga bacteriana total presente en muestras de esputo cuantificadas por PCR en tiempo real del gen 16S rRNA. Se puede observar una mayor carga en los pacientes más severos (que incluye los graves-muy graves)

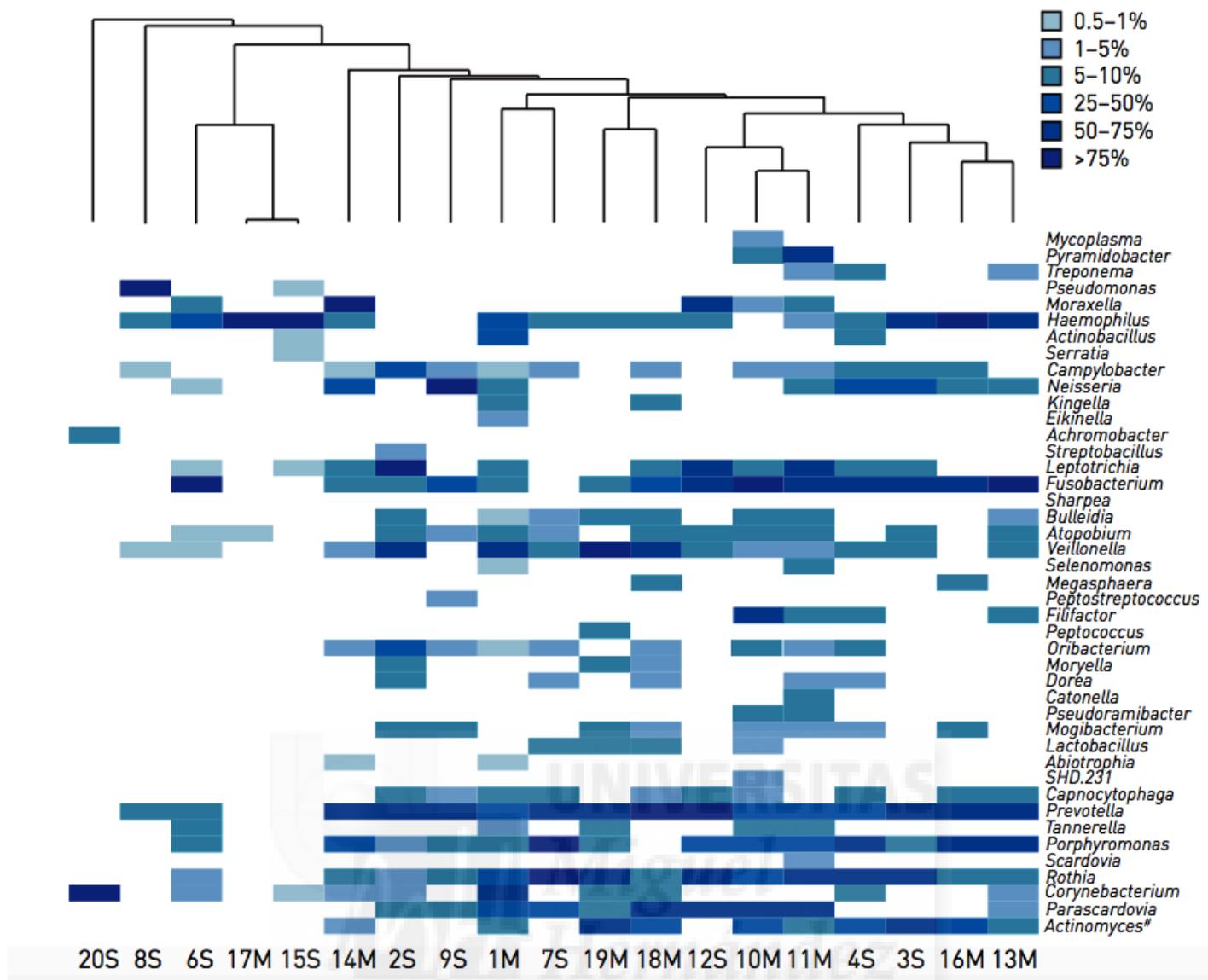


Figura 19: Perfiles taxonómicos bacterianos por género y agrupamiento de muestras por composición de similitud.

Se contó el número de lecturas asignadas a cada género y se calculó la abundancia relativa para cada género. El agrupamiento en el eje “x” se basa en la composición bacteriana de cada muestra de esputo de EPOC, el eje “y” muestra la abundancia relativa de cada género. El asterisco (*) muestra el género *Actinomyces*.

Al analizar la clasificación de las secuencias obtenidas de cada muestra por un análisis de β -diversidad del tipo *UniFrac* (normalizada en peso) observamos que la mayoría de las muestras de pacientes con procesos leves-moderados muestran una composición de géneros bacterianos muy similar, excepto la muestra 17M (figura 20). Esta similitud de composición en el grupo leve-moderado es tal que se puede observar un *core* bacteriano común a todas ellas compuesto por los géneros *Actinomyces*, *Rothia*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* y *Haemophilus*. Obteniéndose así un patrón de agrupación en los análisis PCoA (muestras 10M, 11M,

14M, 18M, 19M, (figura 20), aunque la muestra 4S también mostró una composición muy similar compartiendo dicho *core*. En cambio, la composición de los géneros bacterianos en las muestras de los pacientes con patologías graves-muy graves (2S, 3S, 4S, 6S, 7S, 8S, 9S, 12S, 15S, 20S) presentaban grandes diferencias entre sí y con los del grupo anterior; el *core* es desplazado por otros géneros obteniéndose como resultado un descenso en la biodiversidad de la mucosa respiratoria observándose una mayor dispersión de los puntos en el análisis PCoA (figura 20). En las muestras 20S, 15S y 8S se observó un desplazamiento total del microbioma de la mucosa respiratoria y se vio que es sustituido por un único género bacteriano: *Corynebacterium* (20S), *Haemophilus* (15S) y *Pseudomonas* (8S); en la muestra 17M también se vio un desplazamiento del microbioma ocasionado también por *Haemophilus* spp.

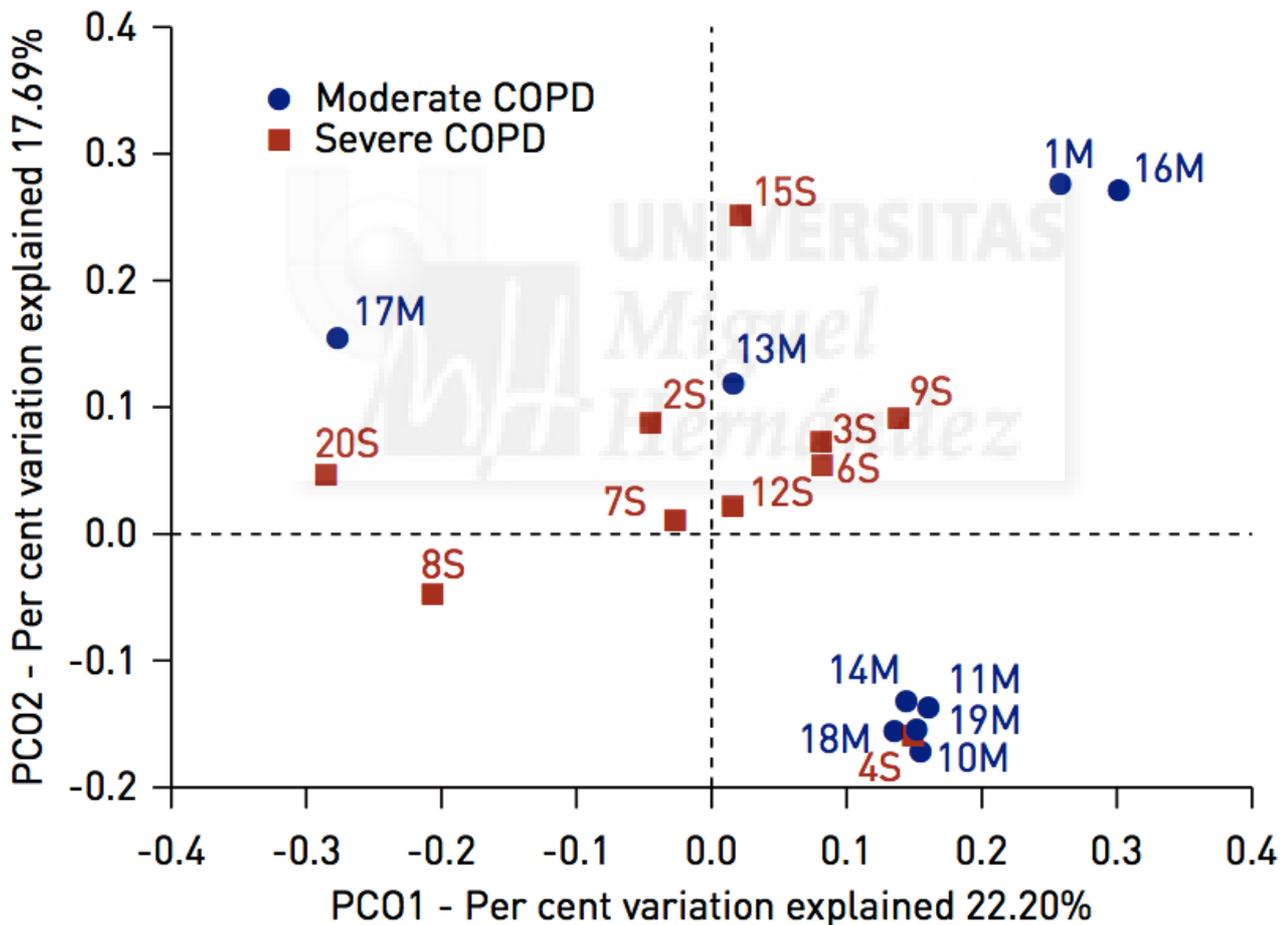
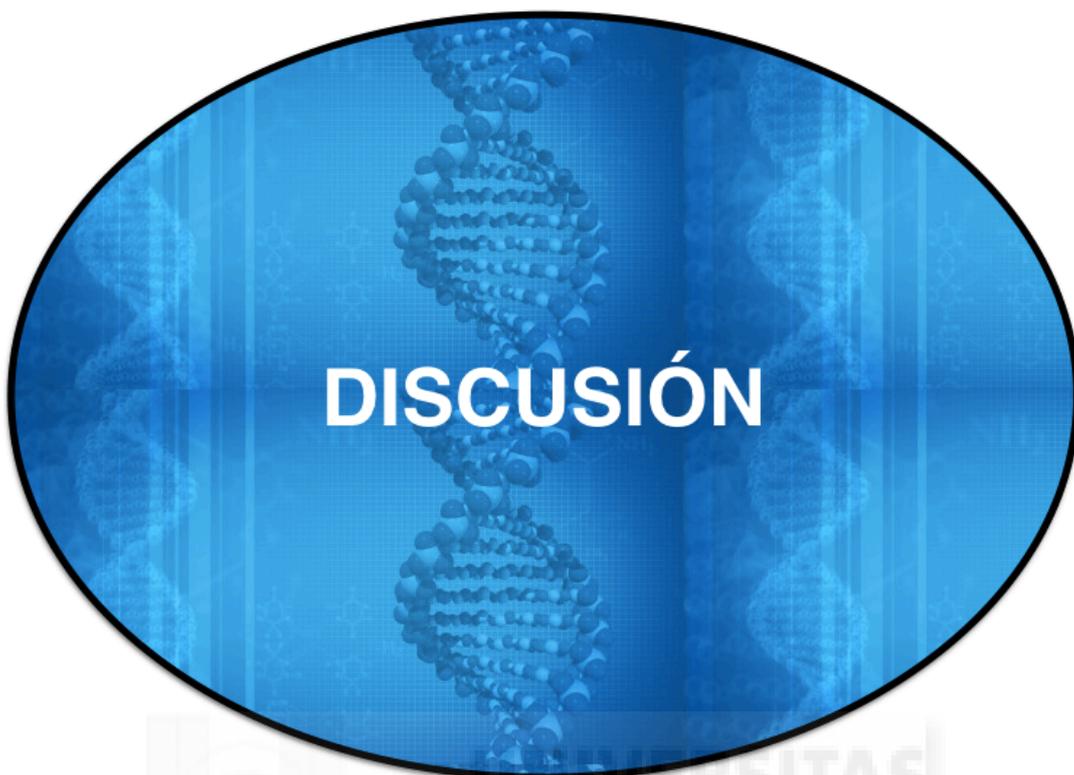


Figura 20: Análisis de coordenadas principales 2D.

Los círculos azules pertenecen a muestras de EPOC moderada, los cuadrados rojos pertenecen a muestras de EPOC grave. Muestras severas y muestras moderadas, separadas unas de otras, las muestras 10M, 11M, 14M, 18M y 19M mostraron una composición bacteriana muy similar.



Dada la importancia de la EPOC como causa mundial de morbi-mortalidad, y la carga social y económica que ésta supone, son necesarios estudios que nos ayuden a tener una mayor comprensión de la misma, especialmente en lo concerniente a las interacciones del microbioma pulmonar, ya que se ha visto que tienen un papel fundamental en la progresión de esta enfermedad. En este estudio hemos realizado una serie de observaciones que son muy interesantes a la hora de la comprensión de dicha enfermedad, sin embargo este debería ser la base de futuros estudios.

La naturaleza anatómicamente intrínseca de los pulmones presenta dificultades en cuanto al muestreo de su microbioma. En diversos estudios se han utilizado para su caracterización muestras, tales como LBA, biopsia de tejido, o esputo. En este estudio hemos optado por utilizar esputo producido espontáneamente, ya que ofrece un método de muestreo no invasivo y, por lo tanto, podría ser el método más fácil de recolección de muestras si el análisis del microbioma en pacientes con EPOC se vuelve clínicamente útil. Sin embargo, trabajos recientes han sugerido que las muestras de esputo y LBA ofrecen representaciones espacialmente distintas del microbioma pulmonar. Las muestras de LBA parecen representar la flora de la mucosa bronquial inferior y las muestras de esputo del tracto bronquial superior (Cabrera-Rubio y col. 2012). Por lo tanto, se debe tener cuidado en la interpretación de los estudios de microbioma de la EPOC en vista de la diferencia entre regiones espacialmente distintas del pulmón. Por otro lado, probablemente, nuestra muestra de pacientes no represente a todos los pacientes con EPOC, porque obviamente sólo incluimos a los pacientes que espectoraban espontáneamente. Sin embargo, en el estudio de Garcia-Aymerich y col. (2011), la frecuencia de expectoración de esputo fue similar en todos los subtipos de EPOC estudiados.

El cultivo de esputo ha sido considerado un método fiable para la obtención de datos microbiológicos (Angrill y col. 2005) y, a pesar de sus limitaciones, sigue siendo la investigación microbiológica predominante a nivel clínico en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Sykes y col. 2007). La colonización bacteriana en la EPOC ha demostrado ser un factor importante en la progresión de la enfermedad y las exacerbaciones (Wilkinson y col. 2003, Patel y col. 2002, Rangelov y Sethi 2014), y se asocia con con aumento de la inflamación de las vías respiratorias y la inflamación sistémica, aumento de la frecuencia de exacerbación, y una aceleración del deterioro de la función pulmonar. Es de vital importancia tener en cuenta que en el estudio del microbioma de las secreciones respiratorias durante la exacerbación se identifican géneros que aumentan en su abundancia relativa, así como la flora colonizadora, que no se modifica. En una fracción de los episodios este incremento en la abundancia de la bacteria causal no

es identificado por el cultivo, que únicamente recupera microorganismos sin cambios en su abundancia relativa respecto a las muestras obtenidas en estabilidad, aunque estos sean potencialmente patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa*. Este último aspecto fue observado en el estudio de Millares y col.(2014). Así pues, el examen del microbioma respiratorio confirma que en una parte de las exacerbaciones el aumento en un patógeno bacteriano pasa desapercibido para la microbiología convencional, por sus limitaciones de sensibilidad (ya que no son capaces de aislar bacterias fastidiosas o emergentes) y el cultivo identifica muchas veces microorganismos que en realidad son únicamente colonizantes, lo que da una información equívoca para el clínico. En esta misma línea, y haciendo referencia a las limitaciones del cultivo con determinadas bacterias auxotrófas, en nuestro estudio hemos identificado más frecuentemente *Haemophilus spp.* y *Moraxella spp.* mediante pirosecuenciación que por los métodos convencionales. *Haemophilus influenzae* es a menudo el patógeno potencial más comúnmente identificado en estados estables y en exacerbación, junto con *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella Catarrhalis*, por ello resulta de vital importancia conocer su presencia siempre en las muestras respiratorias y conocer los cambios en su abundancia relativa, y como ya hemos indicado anteriormente ambas cosas se subestiman con el cultivo. En concordancia con lo dicho, las técnicas independientes del cultivo han desarrollado durante las dos últimas décadas métodos moleculares para detectar patógenos como *H. influenzae*. La lipoproteína D de superficie altamente conservada tanto en la cepas encapsuladas como en las no encapsuladas, ha dado lugar a que su gen (Hpd) sea un atractivo a la hora de su detección (Wang y col. 2011). De hecho, los estudios que han comparado las tasas de detección bacteriana usando cultivo y PCR han demostrado consistentemente mayor sensibilidad con PCR. Las tasas de detección de *H. influenzae* en hisopos nasofaríngeos recogidos de individuos sanos son 2,5-3 veces mayores con PCR en comparación con el cultivo (Tian y col. 2012). Las técnicas basadas en la secuencia del gen 16S que codifica el ARN ribosómico bacteriano además de mejorar su detección han mejorado una mayor comprensión de su papel dentro del conjunto del microbioma pulmonar. Esta mayor prevalencia de microorganismos especialmente auxotrófos que son encontrados con mayor frecuencia en las técnicas de secuenciación y en las del estudio del microbioma, debe analizarse con mucha más profundidad para optimizar el tratamiento antibiótico que se administra normalmente de forma empírica en estos pacientes. Esta optimización se puede conseguir aplicando esta nueva metodología.

Por tanto, y en consonancia con lo anterior, el uso de métodos moleculares tales como la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen ribosómico 16S (ADNr), seguido por la clonación y secuenciación de Sanger tradicional en muestras de secreción bronquial,

han permitido la identificación de especies bacterianas no detectadas anteriormente por cultivos selectivos utilizados para la identificación de microorganismos potencialmente patógenos y, más recientemente, la aplicación de pirosecuenciación ha llevado al estudio de la diversidad microbiana a un nivel de detalle sin precedentes (Charlson y col. 2011, Erb-Downward y col. 2011, Hilty y col. 2010). Dichos estudios han demostrado que existe una amplia diversidad de microorganismos en las secreciones respiratorias que no se detectan mediante cultivo (Guss y col. 2011) y sugieren que el microbioma bronquial puede ser heterogéneo en la EPOC, con diferencias significativas entre las secciones bronquiales (Erb-Downward y col. 2011) (figura 21). Este método último de secuenciación se ha aplicado en varios estudios del microbioma bronquial en la EPOC en muestras esputos y otras muestras respiratorias, y más concretamente son varios de ellos los que utilizan la misma metodología que en el presente estudio, es decir el pirosecuenciador 454 (Hilty y col. 2010, Erb-Downward y col. 2011, Cabrera Rubio y col. 2012, Sze y col. 2012, Pragman y col. 2012, Molyneux y col. 2013, Huang y col. 2014, Millares y col. 2014, Garcia-Núñez y col. 2014, Millares y col. 2015, Sze y col. 2015).

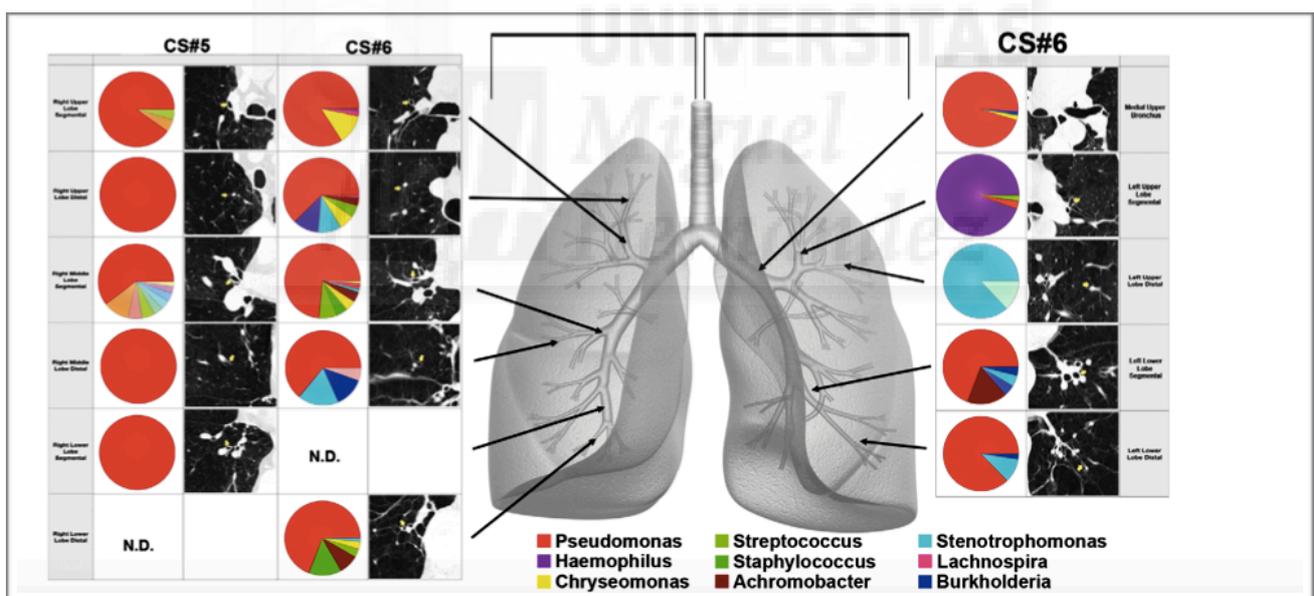


Figura 21: Heterogenicidad en cuanto a las secciones pulmonares de la microbiota en la mucosa bronquial en pacientes de EPOC graves. Erb-Downward y col. (2011).

Así en el presente estudio, utilizando la secuenciación de nueva generación proporciona información novedosa sobre la microbiota del esputo en pacientes con EPOC en una situación clínica estable. Como era de esperar, la metagenómica fue capaz de detectar un número significativamente mayor de bacterias que el cultivo convencional (Tabla 13 y 14). Por lo tanto, refleja con mayor precisión la amplia biodiversidad bacteriana presente en la mucosa respiratoria de

estos pacientes, ya que más del 70% de las bacterias presentes en la mucosa respiratoria no pueden cultivarse (Williamson y Yooseph 2012, Han y col. 2012, Achtman y Wargner 2008). Nuestros datos confirman una fuerte evidencia de que los métodos basados en el cultivo sólo detectan una pequeña proporción de bacterias presentes en el tracto respiratorio, como se ha informado ya previamente en pacientes con fibrosis quística (Bittar y col. 2008).

Así pues, la dificultad de cultivar géneros como *Treponema*, *Mycoplasma*, *Eikenella*, *Kingella* o *Capnocytophaga*, no permitió la identificación a través del cultivo pero sí por técnicas como la pirosecuenciación. Este hecho va en la misma línea de lo comentado anteriormente, en cuanto a las limitaciones del cultivo, todas esas bacterias son difícilmente cultivables o auxotrófas, y el hecho de su identificación podría ser importante a la hora de conocer su posible potencial patogénico en las enfermedades respiratorias o en este caso de la EPOC. El posible papel de otros miembros de la comunidad bacteriana con potencial patogénico a nivel respiratorio se ha sugerido en el estudio de Huang y Lynch (2010), como por ejemplo *A. cryaerophilus*, *B. diminuta* y *L. interrogans*. Estos autores propusieron que estos microorganismos deberían ser objeto de una mayor investigación, dado que muchas de estas especies han estado implicadas en otros procesos patogénicos como la endocarditis (Han y Andrade 2005, Marques da Silva y col., 2006, Paster y col. 2002) y bacteriemia (Hsueh y col. 1997, Woo y col. 2001). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que *L. interrogans*, agente causante de la leptospirosis humana (Gaudie y col. 2008), induce lesiones pulmonares en un modelo animal experimental de infección de las vías aéreas (Marinho y col., 2009) y hemorragia pulmonar en pacientes graves (Dall'Antonia y col. 2008). Su potencial en patogénesis sugiere la posibilidad de un papel para estos organismos en la enfermedad pulmonar crónica de la EPOC. Por este motivo se hacen necesarios futuros estudios que impliquen análisis funcionales y etiológicos para evaluar esta cuestión más a fondo. De todas formas, también se ha sugerido que la aparición de nuevas cepas de patógenos ya conocidos tienen un papel a la hora del desarrollo de la inflamación y aparición de las exacerbaciones de la EPOC (Sethi y col. 2002, Sethi y Murphy 2008, Chin y col. 2005). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos podido llegar a la especie, con lo cual esto es una limitación a la hora de estudiar la aparición de nuevas cepas.

Por otra parte en nuestro estudio observamos que el filo más representativo fue *Firmicutes* y *Proteobacteria* ya que estuvieron presentes en todas las muestras, seguidos de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacterias*, este hallazgo coincide con otros estudios como Hilty et al. (2010), Huang y col. (2014), Pragman y col. (2012), Sze y col. (2012), los cuales también encontraron mayormente incrementados los *Firmicutes* durante la mayoría de las etapas de la enfermedad de EPOC. Sin embargo, esto contrasta con Einarsson y col. (2016), que no encontró diferencias

significativas entre tales filos en pacientes estables. Y también coincidimos con Erb-Downward y col. (2011) y Hilty y col 2010, ya que ellos observaron una mayor representación de *Proteobacteria* en fases más avanzadas, y en nuestro estudio existe también en las fases más avanzadas de EPOC un desplazamiento de la flora hacia un solo microorganismo, entre los que se encuentran *Haemophilus spp.* y *Pseudomonas spp.*, ambos dos incluidos en el filo *Proteobacteria*. Esto último está en discordancia con Pragman y col. (2012), observó una reducción del filo *Proteobacteria* en el grupo de EPOC más severo, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Más recientemente, el estudio de Lee y col. (2016) encontró en pacientes con EPOC estable que el filo más común en el grupo moderado fue *Firmicutes*, seguido por *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* y *Proteobacteria*. Mientras que los mismos cuatro filos también estaban presentes en el grupo grave de EPOC, el orden en abundancia relativa fue diferente, siendo *Bacteroidetes* el más común, seguido por *Firmicutes*, *Fusobacteria* y *Actinobacteria*. En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas entre el orden de frecuencias de los filos entre los dos grupos de comparación (figura 17).

Los miembros pertenecientes a los géneros de *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Rothia*, *Veillonella*, *Porphyromonas* y *Haemophilus*, fueron individualmente, los géneros identificados más frecuentemente en las muestras de esputos. En este sentido coincidimos con Cabrera-Rubio et al. (2012) y otros estudios previos, ya que los géneros que encontró más comúnmente son *Streptococcus*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Acinetobacter*, *Neisseria* y *Moraxella*. De hecho, en la tabla 7 se muestran los géneros y especies más frecuentemente presentes en la EPOC estable.

Además los géneros anaerobios, especialmente los estrictos, como *Veillonella*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Pascardovia* y *Bulleidia*. solo pudieron identificarse mediante pirosecuenciación. En el presente estudio, todos los pacientes tenían anaerobios, que representaron alrededor del 15% de la carga bacteriana (tabla 14). Llegados a este punto, cabría destacar que no incluimos medios para anaerobios en nuestro estudio con su consecuente incubación en atmósfera anaeróbica. Sin embargo, Einarsson y col. (2016), estudió tres grupos de pacientes uno de personas sanas, otro de fumadores sin patología respiratoria y el tercer grupo de pacientes con EPOC, y sí incluyó medios para anaerobios, hayando siempre en el cultivo un mayor número de bacterias aeróbicas que anaeróbicas, y comparándolo con la secuenciación encontró una escasa correlación entre ambos métodos en cuanto al número de bacterias anaerobias especialmente para los géneros *Prevotella* y *Veillonella* ($\kappa = 0.312$ [$p = 0.015$] y $\kappa = 0.177$ [$p = 0.049$], respectivamente). Con lo cual este hecho subraya aún más la utilidad de estas técnicas no basadas

en el cultivo. A colación con lo anterior, en nuestra serie, *Prevotella spp.* estuvo presente en el 90% de los pacientes con EPOC, pero en una proporción muy baja (alrededor del 4% de la carga bacteriana; tabla 14). En este estudio no hemos encontrado diferencias en cuanto a una mayor o menor frecuencia de aparición de anaerobios en los dos grupos estudiados, con lo cual no podemos sugerir que estén asociados a una mayor o menor severidad. Sin embargo, estudios como el Hilty y col. (2010), encontró que el filo *Bacteroidetes*, y particularmente el género *Prevotella spp.* fue más frecuente en los controles que los pacientes asmáticos o en los pacientes con EPOC. Un estudio más actual, Einarsson y col. (2016), observó en pacientes con EPOC estable que una serie de bacterias anaerobias comunes, tales como *Prevotella spp.*, *Veillonella spp.* y *Actinomyces spp.*, se redujeron en la EPOC en comparación con los grupos de comparación sanos, y ello podría apuntar a un papel beneficioso o de "estado normal" para estas bacterias. Por el contrario, Lee y col. (2016) en su estudio con pacientes estables determinó que *Bacteroidetes* (que incluye normalmente géneros como anaerobios *Prevotella* y *Bacteroides*) fue el más común seguido por otros, en pacientes de más gravedad. Además, es razonable destacar que sabe que *Prevotella spp.* parece inhibir el crecimiento de otras bacterias (flora comensal) que pueden desempeñar un papel en la respuesta inmune (Hilty y col. 2010). Por otro lado, Larsen y col. (2012), también sugirió que coexposición de *Prevotella spp.* con los microorganismos potencialmente patógenos en EPOC, redujo la respuesta dendrítica de IL-12 p70 relacionada con *H. influenzae* (Larsen y col. 2012). La importancia en de los anaerobios se ha sugerido por otros autores en enfermedades respiratorias como fibrosis quística. Tunney y col. (2008), en sus resultados proporcionaron una evidencia convincente de que los pulmones de pacientes con fibrosis quística no sólo están colonizados crónicamente con patógenos, como *P. aeruginosa*, sino también por una serie de otras especies bacterianas, muchas de ellas anaerobias, que se presentan con una alta frecuencia de los pacientes con fibrosis quística estable, con cantidades mayores de anaerobios en esputo iguales o mayores que los de *Pseudomonas*. En varias muestras, se detectó más de una especie anaerobia o género, lo que indica que los anaerobios exhibieron una diversidad microbiana mucho mayor que la asociada con el pulmón de la fibrosis quística. Además, se detectó especies anaerobias similares en múltiples muestras recogidas de los mismos pacientes en diferentes momentos, lo que sugiere la persistencia de estas bacterias en el pulmón de estos pacientes. Y además este autor sugirió que los anaerobios pueden producir un ambiente favorable para la infección posterior con *P. aeruginosa*. O'Neill y col. (2015), en pacientes con fibrosis quística mostraron que un menor número de colonias de bacterias anaerobias también se correlacionó con mayores niveles de proteína C reactiva y con un empeoramiento del índice de aclaramiento pulmonar e inflamación. A la vista de estas

observaciones y por lo tanto, para determinar si las bacterias anaerobias contribuyen a la simbiosis en salud y/o enfermedad, se requieren estudios adicionales, centrados en las capacidades funcionales que estos taxones muestran dentro de la estructura comunitaria compleja que se halla en las vías respiratorias inferiores. Y en este sentido, cabe resaltar el papel tan importante de las técnicas de secuenciación que pueden permitir obtener una mejor comprensión de este complejo grupo de bacterias que hasta la fecha son poco conocidas debido a las graves limitaciones de los métodos basados en el cultivo para aislar estos microorganismos.

De los nueve pacientes en los que la familia *Enterobacteriaceae* se aisló por cultivo convencional, en sólo uno de ellos el aislamiento se confirmó por pirosecuenciación (tabla 14). Una discordancia similar se observó al evaluar a los pacientes en los que el género *Actinomyces* estaba presente por cultivo convencional en comparación con los resultados de pirosecuenciación (tabla 14). Esto se debe probablemente al hecho de que estos géneros están sobrestimados por el cultivo a pesar de que los pacientes presenten cargas bacterianas muy bajas, ya que los cebadores usados son capaces de amplificarlos (Bailey y col. 2010, Mammen y Sethi 2016). Este hecho, es de interés clínico ya que se considera que la familia *Enterobacteriaceae* son patógenos importantes en la EPOC (Hilty y col. 2010) y son frecuentemente aislados en el cultivo convencional, como en nuestras muestras. Dado que esto puede modificar los patrones de tratamiento con antibióticos, otros estudios deberían explicar el papel de este género en pacientes con EPOC.

En los análisis de α -diversidad al comparar ambos grupos de pacientes a nivel de género, se observa que los que padecen un proceso leve-moderado presentan mayor biodiversidad bacteriana en sus mucosas respiratorias que si los comparamos con los que padecen un proceso grave-muy grave. Indicando en los pacientes graves-muy graves una dominancia de ciertos microorganismos. Además, el grupo de pacientes graves-muy graves presentaban una carga bacteriana superior respecto al grupo de pacientes leves-moderados. Pragman y col. (2012), no encontraron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la gravedad en la diversidad microbiana del árbol bronquial de los enfermos con la EPOC. Sin embargo García-Núñez y col. (2014), encontró resultados parcialmente similares a los nuestros ya que obtuvieron una mayor diversidad microbiana en pacientes con enfermedad de moderada a grave, y una disminución significativa de la diversidad en los pacientes con enfermedad más avanzada cuando se evaluaron por Shannon (índice de la diversidad alfa). Sugiriendo que la mayor severidad que caracteriza la EPOC avanzada es paralela a una disminución en la diversidad del microbioma bronquial, con una pérdida de parte de la flora residente que es reemplazada por una microbiota más restringida que incluye los potenciales

patógenos. Esta discrepancia entre estudios podría estar atribuida probablemente a la heterogenicidad a la hora de selección de los pacientes y del muestreo.

La diferente microbiota presente en pacientes con diferente grado de gravedad puede explicarse con que la sustitución del microbioma originalmente residente observado en EPOC avanzada puede deberse en parte a los cambios estructurales del árbol bronquial que caracterizan la enfermedad en esta etapa de gravedad y puede estar influenciada por la necesidad recurrente de antibióticos para el tratamiento de la exacerbación. La mayor abundancia de géneros que incluyen a los microorganismos potencialmente patógenos en pacientes con EPOC avanzada puede contribuir al mantenimiento de la respuesta inflamatoria crónica en la mucosa bronquial, lo que afectaría aún más los cambios en la mucosa bronquial de la enfermedad avanzada. Esta es la hipótesis del círculo vicioso, que en consecuencia, puede ser importante para la historia natural de la enfermedad, ya que explica cómo la colonización perpetúa la inflamación y contribuye al progreso de la EPOC. En esta progresión juega un papel importante el sistema inmunológico, ya que se conoce que los macrófagos de la respuesta inmune innata están suprimidos en EPOC (Taylor y col. 2010), y este hecho podría favorecer aún más la colonización bacteriana y ello también va unido a una mayor inflamación de las vías respiratorias (Hill y col. 2000, Patel y col. 2002, Wilkinson y col. 2003, Sethi y col. 2010).

En cuanto al análisis de la beta-diversidad, observamos que la mayoría de las muestras de pacientes con procesos leves-moderados muestran una composición de géneros bacterianos muy similar, así se determinó un *core* bacteriano común a todas ellas compuesto por los géneros *Actinomyces*, *Rothia*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* y *Haemophilus*. Esto coincide parcialmente con los géneros candidatos que constituyen el núcleo o *core*, en una serie de estudios del microbioma pulmonar en pacientes con EPOC, los cuales incluyen *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus spp.*, *Prevotella spp.* y *Fusobacteria spp.* (Han y col. 2012). En cambio, y en nuestro estudio, la composición de los géneros bacterianos en las muestras de los pacientes con patologías graves-muy graves presentan grandes diferencias entre sí y con los del grupo anterior; el *core* es desplazado por otros géneros obteniéndose como resultado un descenso en la biodiversidad de la mucosa respiratoria. Esto último coincide con García-Núñez y col. (2014), ya que sugirió una pérdida de parte de la flora residente es reemplazada por una microbiota más restringida que incluye a potenciales patógenos.

Por otro lado, este trabajo aporta datos que muestran que además de la diferencia en la biodiversidad bacteriana, la carga bacteriana absoluta presente en los dos grupos de pacientes es superior en las patologías más graves y este hecho se complementa con los datos ya conocidos que indican que en la fase estable, la carga de las vías respiratorias altas está correlacionada con una mayor severidad, una mayor limitación al flujo aéreo y una mayor dosis de corticoesteroides inhalados. Esta correlación con la progresión de la enfermedad sugiere una antibioticoterapia adecuada en los pacientes colonizados podría ser beneficiosa. Y en esta línea, el estudio de Singh y col. (2014), que estudió a pacientes con EPOC estable por qPCR, observó una correlación directa entre la carga de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* y la inflamación de las vías respiratorias y el fibrinógeno plasmático. Huang y col. (2014) que observaron cambios en la abundancia relativa de algunos taxones antes y después de la exacerbación, determinaron había una correlación positiva entre la abundancia de *Haemophilus spp.* y de muchos otros taxones relacionados con el filogenéticamente, mientras que se halló una correlación negativa en cuanto a los taxones más alejados de *Haemophilus spp.* filogenéticamente. Millares y col. (2014), encontró que las exacerbaciones se asociaron con un aumento selectivo de la abundancia relativa de taxones clásicamente asociados con exacerbaciones (por ejemplo, *Haemophilus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Moraxella spp.*) a pesar de los resultados inconsistentes obtenidos de las técnicas de cultivo. Este aspecto va en concordancia con lo que en nuestro estudio hemos observado ya que existe una dominancia o aumento de la carga bacteriana de determinados microorganismos en los estadios más severos aunque en nuestro caso no son filogenéticamente similares. Por tanto, puede decirse que a medida que aumenta la severidad de la EPOC e incluso cuando ésta va a desembocar en una exacerbación, hay un aumento de la abundancia relativa o lo que es lo mismo un predominancia de determinados microorganismos sobre otros, que además según algunos autores pueden estar filogenéticamente relacionados. Todo ello, podría indicar que la dinámica de microbiomas y el enriquecimiento de taxones estrechamente relacionados con un patógeno dominante podría contribuir a la patogénesis de la exacerbación. De hecho una tendencia similar se ha observado en patología intestinal, en el cual un patógeno como *Salmonella spp.* supera la flora intestinal conduciendo a la patología, colitis (Hajishengallis y col. 2012).

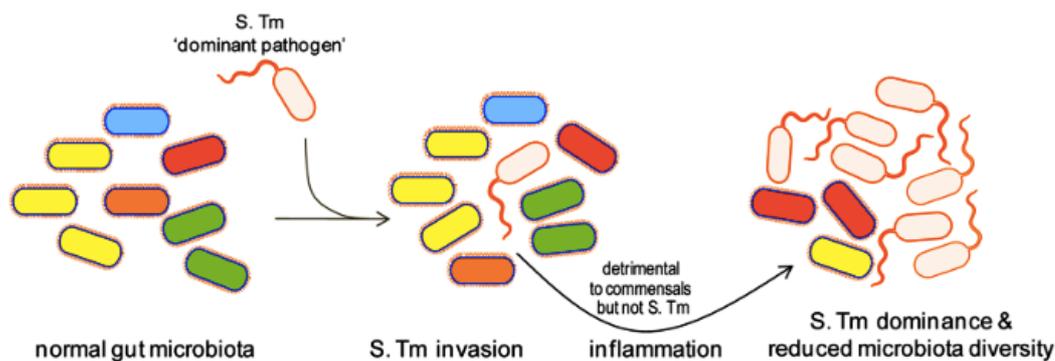


Figura 22: Inflamación inducida por patógenos dominantes y efectos sobre la microbiota.

Salmonella enterica Serovar *Typhimurium* (S. Tm) induce la inflamación, altera la composición del microbioma y supera a la microbiota intestinal residente, todo ello conduce a la colitis. Por lo tanto, S. Tm incita a la enfermedad inflamatoria mientras, al mismo tiempo, se convierte en la especie dominante.

Hajishengallis y col. (2012).

Al hilo de lo anterior, si relacionamos la diversidad bacteriana con la abundancia relativa, en este estudio como ya se ha indicado en alguna ocasión, se ha observado un aumento de la carga bacteriana y una reducción de la diversidad a medida que aumenta la severidad de EPOC. Esta relación también se ha visto en otros estudios, como el de Garcia-Nuñez y col. (2014), que observaron que en los pacientes con enfermedad más grave hay una sobre-representación de *Proteobacteria* junto con una disminución de bacterias pertenecientes a los *Firmicutes*, lo que supondría una reducción de la diversidad. Los autores especularon que los cambios en el microbioma pulmonar en pacientes con EPOC más grave podrían deberse a alteraciones de las vías respiratorias típicas de pacientes muy graves o al uso repetido de antibióticos. La alteración en la composición del microbioma observada puede inducir una inflamación pulmonar adicional que contribuye al empeoramiento de la enfermedad. Más recientemente, Sze y col. (2015), al examinar 40 muestras de pulmón de cinco sujetos con EPOC (GOLD etapa 4), confirmaron la reducción en la diversidad microbiana con un aumento relativo de *Proteobacteria* y *Actinobacteria* y una reducción de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Los autores, además, informaron de una asociación significativa entre las alteraciones del microbioma, la extensión del enfisema, la remodelación de los bronquios y los alvéolos y su infiltración por las células T CD4. Sze y col. plantean la hipótesis de que el aumento de la abundancia de *Proteobacteria* y *Actinobacteria* en las vías respiratorias EPOC (GOLD etapa 4) podría estimular una inflamación pulmonar más intensa. Estos últimos hallazgos a su vez contrastan con los encontrados en otros estudios, Pragman y col. (2012) y Wu y col. (2014), que también estudiaron la relación entre abundancia relativa y la diversidad, aunque

dicha discrepancia podría ser debida al pequeño número de pacientes en estos estudios y a las diferencias en cuanto al diseño del estudio. Según otros estudios revisados, Huang y col. (2014), Millares y col. 2014, Wang y col. (2016), indican que los episodios de exacerbación de la EPOC también parecen estar asociados con la disminución de la diversidad microbiana y el aumento de la proporción de *Proteobacterias*. Por lo tanto, existe más bien concordancia en el hecho de que con la progresión de la enfermedad, hay una reducción en la diversidad microbiana con un aumento en cuanto a abundancia de algunos filos (*Proteobacteria* y *Actinobacteria*) y una reducción de otros que están normalmente presentes en la EPOC y algo similar ocurre durante las exacerbaciones, hecho que es lógico porque una exacerbación es un empeoramiento de los síntomas de esta enfermedad (Miravittles y col. 1999).

En relación con el uso de antibióticos, y dado que se han demostrado mediante numerosos estudios, ya mencionados previamente, los posibles beneficios de los antibióticos (y más concretamente el de los macrólidos también por su efecto antiinflamatorio) en la prevención de las exacerbaciones de la EPOC si estos se administran en fase estable, es importante conocer mejor el microbioma para determinar a qué microorganismo va dirigido dicho antibiótico (dado que por el uso de técnicas convencionales se sobrestiman determinados microorganismos) y en qué momento iniciarlo según una estratificación del riesgo a través del microbioma. Sin embargo, se deberían de realizar estudios más exhaustivos para conocer mejor la interacción entre el microbioma de estos pacientes y la exposición repetida a múltiples antibióticos, y así determinar la influencia de los mismos en la alteración de la misma (Sialer y col. 2012, Han y col 2012, Boersma 2012) siendo *Actinomyces spp.* un indicador que debe ser evaluado para establecer su significación clínica en la evolución de estos pacientes (figura 19), ya que nuestro trabajo encuentra una fuerte asociación entre la presencia de este microorganismo y la gravedad del proceso clínico. Sze y col. (2012), también encontró que *Lactobacillus* era más abundante en es estadio GOLD 4 de EPOC, sugiriendo que podría utilizarse como un iniciador de la inflamación. En la línea de los marcadores microbiológicos, los análisis de regresión de Simon y col. 2016 correlaciona la gravedad de la EPOC (VEF₁ %) con diferencias en la abundancia del género *Streptococcus*, especialmente *S.pneumoniae*. Este estudio sugiere que el microbioma del tracto respiratorio superior de la EPOC podría utilizarse en la estratificación del riesgo del paciente y en la identificación de nuevos métodos de monitoreo y tratamiento, pero se requeriría un estudio de cohorte longitudinal para relacionar inequívocamente estas características del microbioma con la gravedad de la EPOC.

El potencial clínico ofrecido por los métodos metagenómicos, se ha resaltado recientemente en un estudio del microbioma en el intestino humano. Una de las sugerencias derivadas del trabajo fue

que los cambios en ciertas clases funcionales podrían ser utilizados como un factor de riesgo de enfermedad personalizado (Quin y col, 2010), esta es una posibilidad bastante válida, hoy en día, dada la creciente reducción de los costes de la secuenciación y la accesibilidad de las plataformas de secuenciación de ADN. En el contexto de la EPOC, cualquier estrategia médica personalizada tendría que basarse en un muestreo mínimamente invasivo. Se han sugerido una amplia gama de biomarcadores para determinar la progresión de la EPOC y así realizar una estratificación de riesgo de estos pacientes, mejorando de este modo, la supervisión y un tratamiento plausible (Shaw y col. 2014). El microbioma podría ser una fuente efectiva de biomarcadores en la EPOC y ya se ha sugerido, además, como útil para la estratificación de riesgo en la fibrosis pulmonar idiopática (Han y col. 2014). Además estos nuevos métodos, serán capaces de proporcionar información funcional del microbioma respiratorio, de detallar interacciones entre virus, hongos e intervención dirigidos a conservar la flora microbiana que actúa como mutualista y facilitar la funcionalidad del sistema respiratorio frente a los patógenos respiratorios que la sustituyen progresivamente cuando se desarrolla EPOC o fibrosis pulmonar idiopática. Sin embargo, la mayoría de los estudios están más centrados en estudiar complejidad del microbioma en bacterias, incluido el presente estudio, pero hay otros estudios recientes que nos demuestran que la preexposición de las células epiteliales a las bacterias altera la respuesta a la infección viral posterior dependiendo de los tipos de patógeno implicados. Estos hallazgos destacan la complejidad de las interacciones de los microbiomas en las vías aéreas, posiblemente contribuyendo a la susceptibilidad a las exacerbaciones y al curso natural de las enfermedades de las vías respiratorias (Bellinghausen y col. 2016). Al mismo tiempo, cabría resaltar que a pesar de tener una mayor comprensión del microbioma con la utilización de estas nuevas tecnologías, aun hay que superar enormes desafíos para comprender totalmente el papel del microbioma en la EPOC, ya que fenotipos de esta y sus endotipos asociados todavía no están bien definidos y la heterogeneidad del paciente dentro y entre los estudios del microbioma de EPOC aumenta la dificultad para establecer esta relación.

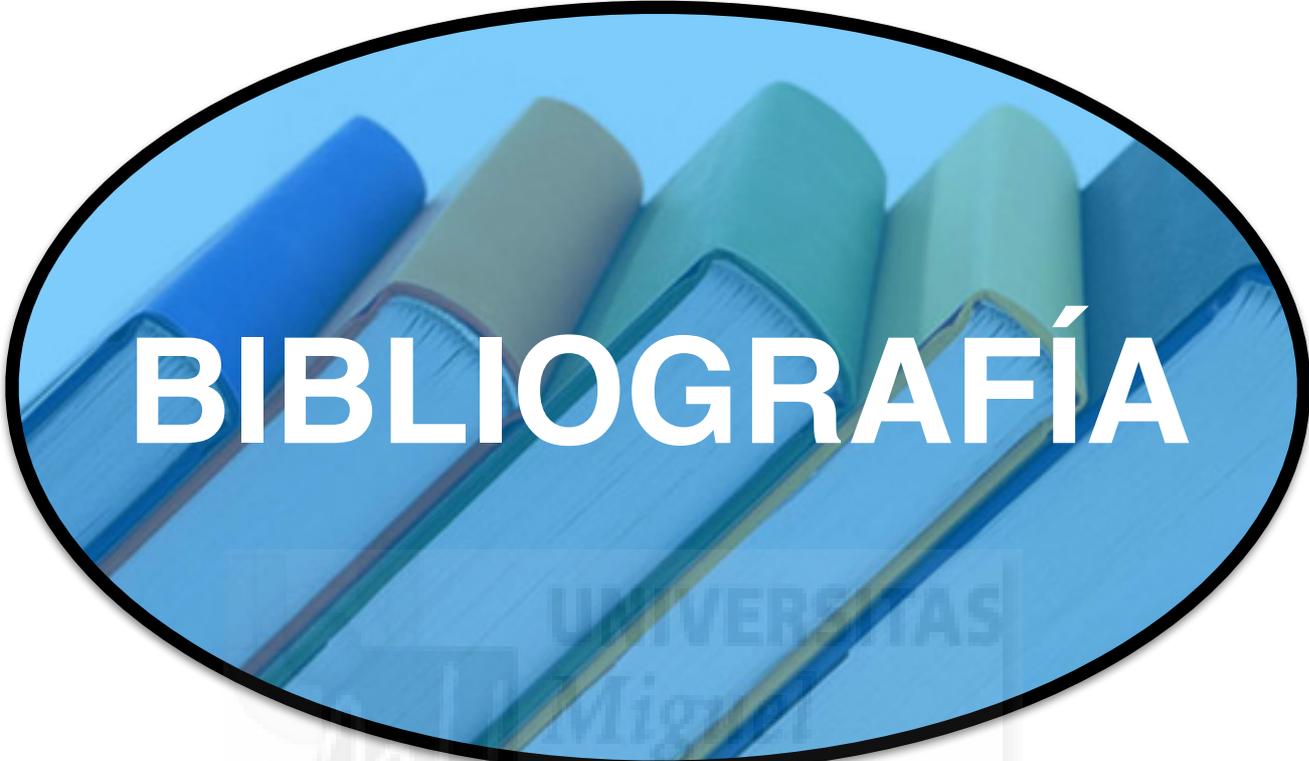
Para finalizar, decir a modo de conclusión, que estas nuevas metodologías, claramente son superiores a los métodos de cultivo microbiológicos tradicionales y abren un nuevo campo que puede mejorar de forma sustancial el diagnóstico y el tratamiento de estos pacientes ya que aportan información sobre la verdadera composición y la evolución del microbioma de la mucosa respiratoria en función de la situación clínica del paciente.



CONCLUSIONES

UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

1. El presente estudio muestra una clara superioridad de los métodos de secuenciación masiva sobre los métodos convencionales como el cultivo a la hora de estudiar la complejidad y heterogenicidad del microbioma pulmonar, especialmente en los pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
2. Los métodos tradicionales de microbiología basados meramente en el cultivo sobreestiman la presencia de bacterias como por ejemplo *Enterobacterias* que pueden dar lugar a errores en cuanto al establecimiento del tratamiento antibiótico por parte del clínico.
3. Utilizando métodos como la secuenciación masiva es posible encontrar nuevas bacterias de difícil crecimiento (e incluso nuevas cepas) o bacterias ya conocidas como algunas anaerobias pero que pueden jugar un papel fundamental en la interacción del microbioma pulmonar y en la progresión de la EPOC.
4. La utilización de técnicas metagénomicas nos ha permitido sugerir que la diversidad en los pacientes leves-moderados es mayor que en los pacientes graves-muy graves. Es decir que la diversidad varía en función de la gravedad, con lo cual podría ser de utilidad a la hora de establecer un tratamiento y de realizar monitorización clínica en estos pacientes.
5. Se ha encontrado que microorganismos como *Actynomices spp.* podrían ser de utilidad como marcador de la severidad de la enfermedad, hecho que también puede ayudar a mejorar el tratamiento clínico de la EPOC.



BIBLIOGRAFÍA

A

Aaron SD, Vandemheen KL, Fergusson D, Maltais F, Bourbeau J, Goldstein R, Balter M, O'Donnell D, McIvor A, Sharma S, Bishop G, Anthony J, Cowie R, Field S, Hirsch A, Hernandez P, Rivington R, Road J, Hoffstein V, Hodder R, Marciniuk D, McCormack D, Fox G, Cox G, Prins HB, Ford G, Bleskie D, Doucette S, Mayers I, Chapman K, Zamel N, FitzGerald M; Canadian Thoracic Society/Canadian Respiratory Clinical Research Consortium. Tiotropium in combination with placebo, salmeterol, or fluticasone-salmeterol for treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized trial. *Ann Intern Med.* **2007**. 146(8): 545-55

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta.* **2006**. 363:83-94

Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology.* **2008**. 6: 431-440

Albert RK, Connett J, Bailey WC, Casaburi R, Cooper JA Jr, Criner GJ, Curtis JL, Dransfield MT, Han MK, Lazarus SC, Make B, Marchetti N, Martinez FJ, Madinger NE, McEvoy C, Niewoehner DE, Porsasz J, Price CS, Reilly J, Scanlon PD, Sciurba FC, Scharf SM, Washko GR, Woodruff PG. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med.* **2011**. 365(8):689-98.

Angrill J, De Agusti C, Celis R, Rañó A, Gonzalez J, Sole T, Xaubet A, Rodriguez-Roisin R, Torres A. Bacterial colonisation in patients with bronchiectasis: microbiological pattern and risk factors. *Thorax.* **2002**. 57:15-9.

Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol.* **2009**. 25(4):195-203.

Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med.* **1987**. 106(2): 196-204.

Arikawa E, Sun Y, Wang J, Zhou Q, Ning B, Dial SL, Guo L, Yang J. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression

measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics*. **2008**. 9: 328.

Atsou K, Chouaid C, Hejblum G. Variability of the chronic obstructive pulmonary disease key epidemiological data in Europe: systematic review. *BMC Med*. **2011**.9:7.

Austin MA, Wills KE, Blizzard L, Walters EH, Wood-Baker R. Effect of high flow oxygen on mortality in chronic obstructive pulmonary disease patients in prehospital setting: randomised controlled trial. *BMJ*. **2010**. 341: e5462.

B

Bagdonas E, Raudoniute J, Bruzauskaite I, Aldonyte R. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. *International Journal of COPD*. **2015**. 10: 995-1013

Ballinger MN, Standiford TJ. Postinfluenza bacterial pneumonia: host defenses gone away. *J Interferon Cytokine Res*. **2010**. 30:643-652.

Banerjee D, Khair OA, Honeybourne D. The effect of oral clarithromycin on health status and sputum bacteriology in stable COPD. *Respir Med*. **2005**. 99:208-15.

Barker BL, Haldar K, Patel H, Pavord ID, Barer MR, Brightling CE, Bafadhel M. Association between pathogens detected using quantitative polymerase chain reaction with airway inflammation in COPD at stable state and exacerbations. *Chest*. **2015**. 147:46-55.

Barnes PJ. Inhaled Corticosteroids. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010. 8;3(3):514-540.

Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, Beck JM, Curtis JL, Huffnagle GB. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio*. **2015**. 6: e00037.

Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, Zaki SR, Hayden FG, Hui DS, Kettner JD, Kumar A, Lim M, Shindo N, Penn C, Nicholson KG. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med*. **2010**. 362: 1708-1719.

Beasley V, Joshi PV, Singanayagam A, Molyneaux PL, Johnston SL, Mallia P. Lung microbiology and exacerbations in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. **2012**. 7: 555-569.

Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. *Transl Res*. **2012**. 160(4):258-66.

Bellinghausen C, Gulraiz F, Heinzmann AC, Dentener MA, Savelkoul PHM, Wouters EF, Rohde GG, Stassen FR. Exposure to common respiratory bacteria alters the airway epithelial response to subsequent viral infection. *Respiratory Research*. **2016**. 17:1-3.

Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Streimer N, Sarles J, Raoult D, Rolain JM. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS ONE*. **2008**. 3:8 e2908.

Blasi F, Bonardi D, Aliberti S, Tarsia P, Confalonieri M, Amir O, Carone M, Di Marco F, Centanni S, Guffanti E. Long-term azithromycin use in patients with COPD and tracheostomy. *Pulm Pharmacol Ther*. **2010**. 23:200-7.

Boersma WG. Antibiotics in acute exacerbations of COPD: the good, the bad and the ugly. *Eur Respir J*. **2012**. 40(1):1-3.

Bousquet J, Kiley J, Bateman ED, Viegi G, Cruz AA, Khaltayev N, Aït Khaled N, Baena-Cagnani CE, Barreto ML, Billo N, Canonica GW, Carlsen KH, Chavannes N, Chuchalin A, Drazen J, Fabbri LM, Gerbase MW, Humbert M, Joos G, Masjedi MR, Makino S, Rabe K, To T, Zhi L. Prioritised research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases. *Eur Respir J*. **2010**. 36:995-1001.

Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol*. **2002**.146(5):707-16

Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E; BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*. **2007**. 370(9589): 741-50.

C

Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, Mira A. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* **2012.** 50(11):3562-8.

Cameron SJ, Lewis KE, Huws SA, Lin W, Hegarty MJ, Lewis PD, Mur LA, Pachebat JA. Metagenomic Sequencing of the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Upper Bronchial Tract Microbiome Reveals Functional Changes Associated with Disease Severity. *PLoS One.* **2016.**11(2):e0149095.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* **2010.** 7:335-336.

Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* **2011.** 184:957-963.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic *influenza A*-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **2009.** 58:1071-1074.

Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, Denning GM, Murphy TF, Sethi S, Look DC. *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med.* **2005.** 172:85-91

Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Med.* **2013.** 5:63.

D

Daniels JM, de Graaf CS, Vlaspolder F. Sputum colour reported by patients is not a reliable marker of the presence of bacteria in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Microbiol Infect.* **2010**.16:583-588.

D'Anna SE, Balbi B, Cappello F, Carone M, Di Stefano A. Bacterial-viral load and the immune response in stable and exacerbated COPD: significance and therapeutic prospects. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* **2016**.11:445-53.

Dall'Antonia M, Sluga G, Whitfield S, Teall A, Wilson P, Krahe D. Leptospirosis pulmonary haemorrhage: a diagnostic challenge. *Emerg Med J.* **2008**. 25: 51–52.

De Serres G, Lampron N, La Forge J, Rouleau I, Bourbeau J, Weiss K, Barret B, Boivin G. Importance of viral and bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *J Clin Virol.* **2009**. 46(2):129-133.

Dickson RP, Huang YJ, Martinez FJ, Huffnagle GB. The lung microbiome and viral-induced exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: new observations, novel approaches. *Am J Respir Crit Care Med.* **2013**. 188(10):1185-6.

Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Rev Respir Med.* **2013**. 7(3):245-57.

Dickson RP, Martinez JF, Huffnagle GB. The Role of the Microbiome in Exacerbations of Chronic Lung Diseases. *Lancet.* **2014**. 384(9944): 691–702.

Dixit D, Bridgeman MB, Andrews LB, Narayanan N, Radbel J, Parikh A, Sunderram J. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: diagnosis, management, and prevention in critically ill patients. *Pharmacotherapy.* **2015**. 35(6):631-48.

Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature.* **2002**. 2;417(6884):95-8.

E

Einarsson GG, Comer DM, McIlreavey L, Parkhill J, Ennis M, Tunney MM, Elborn JS. Community dynamics and the lower airway microbiota in stable chronic obstructive pulmonary disease, smokers and healthy non-smokers. *Thorax*. **2016**. 71(9):795-803.

Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR; Committee on Nonsmoking COPD, Environmental and Occupational Health Assembly. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. **2010**. 182(5): 693-718.

Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB. Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PLoS One*. **2011**. 6(2):e16384.

G

Garcia-Nuñez M, Millares L, Pomares X, Ferrari R, Pérez-Brocal V, Gallego M, Espasa M, Moya A, Monsó E. Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol*. **2014**. 52(12):4217-23.

Garcha DS, Thurston SJ, Patel ARC, Mackay AJ, Goldring JJ, Donaldson GC, McHugh TD, Wedzicha JA. Changes in prevalence and load of airway bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD. *Thorax*. **2012**. 67:1075-1080.

Gaudie CM, Featherstone CA, Phillips WS, McNaught R, Rhodes PM, Errington J. Human *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae infection (Weil's disease) acquired from pet rats. *Vet Rec*. **2008**. 163:599-601.

Gollwitzer ES, Marsland BJ. Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases - Potential for therapy. *Pharmacol Ther.* **2014.** 141(1):32-9. Review.

Gomez J, Banos V, Simarro E. Prospective comparative study (1994-1998) of the influence of short-term prophylactic treatment with azithromycin on patients with advanced COPD. *Rev Esp Quimioter.* **2000.**13:379-83.

González Juárez, Francisco. Diagnóstico y tratamiento en neumología (2a. ed.). Distrito Federal, MÉXICO: Editorial El Manual Moderno, **2016.** ProQuest ebrary. Web. 10 February 2017. Copyright © 2016. Editorial El Manual Moderno.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). **2017.** Management and Prevention of COPD. Disponible <http://www.goldcopd.org/>.

Guía española Gespoc. **2015.** Epidemiología, Guías de práctica clínica, Tratamiento farmacológico y Otras terapias. Disponible: www.gesepoc.com.

Guss AM, Roeselers G, Newton IL, Young CR, Klepac-Ceraj V, Lory S, Cavanaugh CM. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *ISME J.* **2011.**5:20-29.

H

Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The Keystone Pathogen Hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* **2012.** 10: 717-725.

Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* **2006.** 28:523- 32.

Han MK, Huang YJ, Lipuma JJ, Boushey HA, Boucher RC, Cookson WO, Curtis JL, Erb-Downward J, Lynch SV, Sethi S, Toews GB, Young VB, Wolfgang MC, Huffnagle GB, Martinez FJ. Significance of the microbiome in obstructive lung disease. *Thorax.* **2012.** 67(5):456-63.

Han MK, Zhou Y, Murray S, Tayob N, Noth I, Lama VN, Moore BB, White ES, Flaherty KR, Huffnagle GB, Martinez FJ; COMET Investigators. Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study. *Lancet Respir Med.* **2014.** 2: 548-56.

Han XY, Andrade RA. *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother.* **2005.** 55:853-859

Hanania NA, Crater GD, Morris AN, Emmett AH, O'Dell DM, Niewoehner DE. Benefits of adding fluticasone propionate/salmeterol to tiotropium in moderate to severe COPD. *Respir Med.* **2012.** 106(1): 91- 101.

He Z, Ou L, Zhang J, Bai J, Liu GN, Li MH, Deng JM, MacNee W, Zhong XN. Effect of 6 months of erythromycin treatment on inflammatory cells in induced sputum and ex-acerbations in COPD. *Respiration.* **2010.** 80:445-52.

Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *J Clin Virol.* **2000.** 109:188-195

Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS ONE.* **2010.** 5: e8578.

Huang YJ, Kim E, Cox MJ, Brodie EL, Brown R, Wiener-Kronish JP, Lynch SV. A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *OMICS.* **2010.** 14(1):9-59.

Huang YJ, Lynch SV. The emerging relationship between the airway microbiota and chronic respiratory disease: clinical implications. *Expert Rev Respir Med.* **2011.** 5(6):809-21.

Huang YJ, Sethi S, Murphy T, Nariya S, Boushey HA, Lynch SV. Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* **2014.** 52:2813-2823.

Huang YJ, Erb-Downward JR, Dickson RP, Curtis JL, Huffnagle GB, Han MK. Understanding the role of the microbiome in chronic obstructive pulmonary disease: principles, challenges, and future directions. *Transl Res.* **2017**.179:71-83.

Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Wang SK, Chang SC, Ho SW. Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus*. *J Clin Microbiol.* **1997**. 35: 489-491.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* **2005**. 6: 279-84.

J

Jackson H, Hubbard R. Detecting chronic obstructive pulmonary disease using peak flow rate: cross sectional survey. *BMJ.* **2003**. 327(7416): 653-4.

Jamieson AM, Yu S, Annicelli CH, Medzhitov R. Influenza virus-induced glucocorticoids compromise innate host defense against a secondary bacterial infection. *Cell Host Microbe.* **2010**.7:103-114

Jones PW. Health status measurement in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* **2001**. 56(11): 880-7.

Jung KS, Park HY, Park SY, Kim SK, Kim YK, Shim JJ, Moon HS, Lee KH, Yoo JH, Lee SD; Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases study group; Korea Chronic Obstructive Pulmonary Disease study group. Comparison of tiotropium plus fluticasone propionate/salmeterol with tiotropium in COPD: a randomized controlled study. *Respir Med.* **2012**. 106(3): 382-9.

K

Kankaanranta H, Harju T, Kilpelainen M, Mazur W, Lehto JT, Katajisto M, Peisa T, Tuula Meinander T, Lehtimäki L. Diagnosis and Pharmacotherapy of Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The Finnish Guidelines. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* **2015**. 116: 291-307.

Kaerberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*. **2002**. 10;296(5570):1127-9.

Kherad O, Kaiser L, Bridevaux PO, Sarasin F, Thomas Y, Janssens JP, Rutschmann OT. Respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations. *Chest*. **2010**. 138(4):896-904.

Kramer M. The polymerase chain reaction. *Current Protocols in Molecular Biology*. **2001**. 15:1-15

Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, Guzman CA, Abraham WR, Hofle MG. Cohort study of airway mycobiome in adult cystic fibrosis patients: differences in community structure between fungi and bacteria reveal predominance of transient fungal elements. *J Clin Microbiol*. **2015**. 53:2900-7.

Ko FW, Chan KP, Hui DS, Goddard JR, Shaw JG, Reid DW, Yang IA. Acute exacerbation of COPD. *Respirology*. **2016**. 21(7):1152-65.

Kunz LI, Postma DS, Klooster K, Lapperre TS, Vonk JM, Sont JK, Kerstjens HA, Snoeck J, Stroband JB, Hiemstra PS, Sterk PJ; GLUCOLD Study Group. Relapse in FEV₁ Decline After Steroid Withdrawal in COPD. *Chest*. **2015**. 148(2): 389-96.

L

Lacoma A, Prat C, Andreo F, Domínguez J. Biomarkers in the management of COPD. *Eur Respir Rev*. **2009**. 18(112):96–104.

Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, Sondergaard JN, Musavian HS, Butt TM, Brix S. Divergent Pro-Inflammatory Profile of Human Dendritic Cells in Response to Commensal and Pathogenic Bacteria Associated with the Airway Microbiota. *PLOS ONE*. **2012**. 7(2): e31976.

Lederman L. Real-Time PCR. *Biotechniques*. **2008**. 44: 179-83.

Lee SW, Kuan CS, Wu LS, Weng JT. Metagenome and Metatranscriptome Profiling of Moderate and Severe COPD Sputum in Taiwanese Han Males. *PLoS One*. **2016**.11(7):e0159066.

Liu Z, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R. Accurate taxonomy assignments from 16SrRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Research*. **2008**. 36:18 -120.

Lozupone C, Hamady M, Knight R. UniFrac-An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context BMC Bioinformatics. **2006**. 7:371.

M

Mahler DA, Kerwin E, Ayers T, Fowler Taylor A, Maitra S, Thach C, Lloyd M, Patalano F, Banerji D. FLIGHT1 and FLIGHT2: Efficacy and Safety of QVA149 (Indacaterol/Glycopyrrolate) versus Its Monocomponents and Placebo in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med. **2015**. 192(9): 1068-79.

Magnussen H, Disse B, Rodriguez-Roisin R, Kirsten A, Watz H, Tetzlaff K, Towse L, Finnigan H, Dahl R, Decramer M, Chanez P, Wouters EF, Calverley PM; WISDOM Investigators. Withdrawal of inhaled glucocorticoids and exacerbations of COPD. N Engl J Med. **2014**. 371(14): 1285-94.

Mammen MJ, Sethi S. COPD and the microbiome. Respirology. **2016**. 21(4):590-9.

Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. Lancet. **2007**. 370:765-73.

Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo MB, Keadze T, Aniscenko J, Oleszkiewicz G, Gray K, Message SD, Barnes PJ, Adcock IM, Papi A, Stanciu LA, Elkin SL, Kon OM, Johnson M, Johnston SL. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. **2012**. 186:1117-1124.

Marinho M, Oliveira-Junior IS, Monteiro CM, Perri SH, Salomao R. Pulmonary disease in Hamsters infected with *Leptospira interrogans*: histopathologic findings and cytokine mRNA expressions. Am J Trop Med Hyg . **2009**. 80: 832-836.

Marques da Silva R, Caugant DA, Eribe ER, Aas JA, Lingaas PS, Geiran O. Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. J Vasc Surg. **2006**. 44: 1055-1060.

Matkovic Z, Miravittles M. Chronic bronchial infection in COPD. Is there an infective phenotype?. Respir Med. **2013**. 107:10-22.

Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation. *Nature Reviews Genetics.* **2010.** 11:31-46.

Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome research.* **2005.** 15:1767-1776.

Millares L, Ferrari R, Gallego M, Garcia-Nuñez M, Pérez-Brocal V, Espasa M, Pomares X, Monton C, Moya A, Monsó E. Bronchial microbiome of severe COPD patients colonised by *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2014.** 33(7):1101-11.

Millares L, Pérez-Brocal V, Ferrari R, Gallego M, Pomares X, García-Núñez M, Montón C, Capilla S, Monsó E, Moya A. Functional Metagenomics of the Bronchial Microbiome in COPD. *PLoS One.* **2015.** 3;10(12):e0144448.

Miller BE, Tal-Singer R, Rennard SI, Furtwaengler A, Leidy N, Lowings M, Martin UJ, Martin TR, Merrill DD, Snyder J, Walsh J, Mannino DM. Plasma fibrinogen qualification as a drug development tool in chronic obstructive pulmonary disease. Perspective of the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Biomarker Qualification Consortium. *Am J Respir Crit Care Med.* **2016.** 193(6):607-613.

Miravitlles M, Espinosa C, Fernandez-Laso E, Martos JE, Maldonado JA, Gallego M. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. *Chest.* **1999.** 116:40-46.

Miravitlles M, Ferrer M, Pont A, Viejo JL, Masa JF, Gabriel R, Fernando Masa J, Gabriel R, Jiménez-Ruiz CA, Villasante C, Fernández-Fau L, Sobradillo V. Characteristics of a population of COPD patients identified from a population-based study. Focus on previous diagnosis and never smokers. *Respir Med.* **2005.** 99:985-95.

Miravitlles M, Soriano JB, García-Río F, Muñoz L, Duran-Taulería E, Sánchez G, Sobradillo V, Ancochea J. Prevalence of COPD in Spain: Impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax.* **2009.** 64:863-8.

Miravitlles M, Moragas A, Hernández S, Bayona C, Llor C. Is it possible to identify exacerbations of mild to moderate COPD that do not require antibiotic treatment? *Chest.* **2013.** 144:1571-7.

Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, Footitt J, Willis-Owen SA, Homola D, Trujillo-Torralbo MB, Elkin S, Kon OM, Cookson WO, Moffatt MF, Johnston SL. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* **2013.** 15;188(10):1224-31.

Monsó E.The respiratory microbiome: Beyond the culture. *Arch Bronconeumol.* **2016.** (16)30333-7.

Moreno CE. Métodos para medir la Biodiversidad. *M&TManuales yTesis SEA,* **2001.**vol.1:84pp

Moreno CE, Halffter G. On the measure of sampling effort used in species accumulation curves. *Journal of Applied Ecology.* **2001.** 38: 487-490.

Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis.* **2008.** 198:962-970.

Morris A, Sciruba FC, Norris KA. *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD.* **2008.** 5(1):43–51.

N

Nadeem NJ, Taylor SJ, Eldridge SM. Withdrawal of inhaled corticosteroids in individuals with COPD-a systematic review and comment on trial methodology. *Respir Res.* **2011.** 12: 107.

Nannini LJ, Lasserson TJ, Poole P. Combined corticosteroid and long-acting beta(2)-agonist in one inhaler versus long-acting beta(2)-agonists for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* **2012.** 9(9): CD006829.

Nannini LJ, Poole P, Milan SJ, Kesterton A. Combined corticosteroid and long-acting beta(2)-agonist in one inhaler versus inhaled corticosteroids alone for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* **2013.** 8(8): CD006826.

Nakamura S, Maeda N, Miron IM, Yoh M, Izutsu K, Kataoka C, Honda T, Yasunaga T, Nakaya T, Kawai J, Hayashizaki Y, Horii T, Iida T. Metagenomic diagnosis of bacterial infections. *Emerg Infect Dis.* **2008.**14(11):1784-6.

Nishimura K, Izumi T, Tsukino M, Oga T. Dyspnea is a better predictor of 5-year survival than airway obstruction in patients with COPD. *Chest*. **2002**. 121(5): 1434-40.

Nouira S, Marghil S, Beighth M, Besbes L, Elatrous S, Abroug F. Once daily oral ofloxacin in chronic obstructive pulmonary disease exacerbation requiring mechanical ventilation: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. **2001**. 358:2020-5.

O

OIE. (2008). Validación y control de calidad de los métodos de PCR utilizados en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Barcelona.

O'Neill K, Bradley JM, Johnston E, McGrath S, McIlreavey L, Rowan S, Reid A, Bradbury I, Einarsson G, Elborn JS, Tunney MM. 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(5): e0126980.

P

Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonization and the frequency, character and severity of COPD exacerbations. *Thorax*. **2002**. 57:759-764.

Plotkowski MC, Puchelle E, Beck G, Jacquot J, Hannoun C. Adherence of type I Streptococcus pneumoniae to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *Am Rev Respir Dis*. **1986**. 134: 1040–1044.

Pragman AA, Kim HB, Reilly CS, Wendt C, Isaacson RE. The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. **2012**. 7(10):e47305.

Q

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S,

Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing. *Nature*. **2010**. 464: 59-65.

Qiu S, Zhong X. Macrolides: a promising pharmacologic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Respir Dis*. **2016**. 11(3): 147 -155

Quon BS, Gan WQ, Sin DD. Contemporary management of acute exacerbation of COPD: a systematic and meta-analysis. *Chest*. **2008**.133:756-66.

R

Ram FS, Rodriguez-Roisin R, Granados-Navarrete A, Garcia-Aymerich J, Barnes NC. Antibiotics for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. **2006**. (2):CD004403.

Rangelov K, Sethi S. Role of infections. *Clin. Chest Med*. **2014**. 35: 87-100.

Raziel: Mortalidad por todas las causas. Área de Análisis Epidemiológico y Situación de Salud. Disponible en: <http://193.146.50.130/raziel.php>.

Regidor E, Gutiérrez-Fisac JL, Alfaro M. Patrón de mortalidad en España. Madrid: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. **2011**. Disponible en: <http://www.msc.es/ca/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/mortalidad/docs>.

Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, Dodsworth JA, Hedlund B, Tsiamis G, Sievert SM, Liu WT, Eisen J, Hallam S, Kyrpides N, Stepanauskas R, Rubin E, Hugenholtz, Woyke T. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*. **2013**. 499: 431-437.

Roede BM, Bresser P, Bindels PJ, Kok A, Prins M, ter Riet G, Geskus RB, Herings RM, Prins JM. Antibiotic treatment is associated with reduced risk of subsequent exacerbation in obstructive lung disease: a historical population-based cohort study. *Thorax*. **2008**. 63(11):968-973.

Rohde G, Wiethage A, Borg I, Kauth M, Bauer TT, Gillissen A, Bufe A, Schultze-Werninghaus G. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalization: a case-control study. *Thorax*. **2003**.58:37-42.

Rootmensen GN, van Keimpema AR, Jansen HM, de Haan RJ. Predictors of incorrect inhalation technique in patients with asthma or COPD: a study using a validated videotaped scoring method. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* **2010.** 23(5): 323-8.

Rothberg MB, Pekow PS, Lahti M, Brody O, Skiest DJ, Lindenauer PK. Antibiotic therapy and treatment failure in patients hospitalized for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA.* **2010.** 303(20):2035-2042.

Rushton L. Occupational causes of chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Environ Health.* **2007.** 22:195-212.

S

Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet.* **2009.** 374(9691): 733-43.

Shannon CE. The mathematical theory of communication. *MD Comput.* 1997;14(4):306–317.

Schuetz P, Müller B, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, Bouadma L, Luyt CE, Wolff M, Chastre J, Tubach F, Kristoffersen KB, Burkhardt O, Welte T, Schroeder S, Nobre V, Wei L, Bhatnagar N, Bucher HC, Briel M. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev.* **2012.**12(9):CD007498

Seemungal T, Wilkinson T, Hurst J, Perera W, Sapsford R, Wedzicha J. Long-term erythromycin therapy is associated with decreased chronic COPD exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med .* **2008.** 178:1139-47.

Segal LN, Alekseyenko AV, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Gao Z, Chen H, Berger KI, Goldring RM, Rom WN, Blaser MJ, Weiden MD. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome.* **2013.** 1: 19.

Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Ann Am Thorac Soc.* **2014.** 11(1):108-16.

SEIMC. Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior nº 25. **2007.**

Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. **2002**. 347:465-471.

Sethi S, Jones PW, Theron MS, Miravittles M, Rubinstein E, Jadwiga A, Wedzicha JA, Wilson R, the PULSE Study group. Pulsed moxifloxacin for the prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Respiratory Research*. **2010**. 11:10

Sethi S, Murphy T. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. **2008**. 359:2355–2365.

Shaw JG, Vaughan A, Dent AG, O'Hare PE, Goh F, Bowman RV, Fong KM, Yang IA. Biomarkers of progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Thorac Dis*. **2014**. 6: 1532–47.

Sialer S, Adamantia L, Guerrero M, Torres A. Relation between chronic obstructive pulmonary disease and antibiotics. *Curr Infect Dis Rep*. **2012**. 14(3):300-7.

Siddiqi A, Sethi S. Optimizing antibiotic selection in treating COPD exacerbations. *Int J Chron Obstruct Pulm Dis*. **2008**. 3(1):31-44.

Simpson J, Powell H, Baines K, Milne D, Coxson H, Hansbro P, Gibson PG. The effect of azithromycin in adults with stable neutrophilic COPD: a double-blind randomised, placebo-controlled trial. *PLoS One*. **2014**. 9: e105609.

Singh D, Brooks J, Hagan G, Cahn A, O'Connor BJ. Superiority of "triple" therapy with salmeterol/fluticasone propionate and tiotropium bromide versus individual components in moderate to severe COPD. *Thorax*. **2008**. 63(7): 592-8.

Singh R, Mackay AJ, Patel AR, Garcha DS, Kowlessar BS, Brill SE, Donnelly LE, Barnes PJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Inflammatory thresholds and the species-specific effects of colonising bacteria in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. **2014**. 14;15:114.

Sobradillo-Peña VS, Miravittles M, Gabriel R, Jiménez- Ruiz CA, Villasante C, Masa JF, Viejo JL, Fernández-Fau L. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest*. **2000**. 118:981-9.

- Sogin ML**, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2006**.103(32):12115-20.
- Soler N**, Esperatti M, Ewig S, Huerta A, Agustí C, Torres A. Sputum purulence-guided antibiotic use in hospitalised patient with exacerbations of COPD. *Eur Respir J*. **2012**. 40:1344-53.
- Soriano JB**, Ancochea J, Miravittles M, García-Río F, Duran E, Muñoz L, Jiménez-Ruiz CA, Masa JF, Viejo JL, Villasante C, Fernández-Fau L, Sánchez G, Sobradillo-Peña V. Recent trends in COPD prevalence in Spain: a repeated cross-sectional survey 1997- 2007. *Eur Respir J*. **2010**. 36:758-65.
- Sponsler KC**, Markley JD, LaBrin J. What is the appropriate use of antibiotics in acute exacerbations of COPD?. *The Hospitalist*. **2012**. Available at: [www.the-hospitalist.org/article/ what-is-the-appropriate-use-of-antibiotics-in-acute-exacerbations- of-copd](http://www.the-hospitalist.org/article/what-is-the-appropriate-use-of-antibiotics-in-acute-exacerbations-of-copd).
- Staykova T**, Black PN, Chacko EE, Poole P. Prophylactic antibiotic therapy for chronic bronchitis. *Cochrane Database Syst Rev*. **2003**. (1):CD004105.
- Stockley RA**, O'Brien C, Pye A, Hill SL. Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD. *Chest*. **2000**.117(6):1638–1645.
- Stoller JK**, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. **2005**. 365(9478): 2225-36.
- Stoltz D**, Christ-Crain M, Bingisser R, Leuppi J, Miedinger D, Müller C, Huber P, Müller B, Tamm M. Antibiotic treatment of exacerbations of COPD. *Chest*. **2007**. 131(1):9–19.
- Su J**, Liu H ,Tan X, Ji, Y, Jiang Y, Prabhakar M, Rong Z, Zhou H, Zhang G. Sputum Bacterial and Fungal Dynamics during Exacerbations of Severe COPD. *PLoS ONE*. **2015**. 10(7): e0130736.
- Sulaiman I**, Cushen B, Greene G, Seheult J, Seow D, Rawat F, MacHale E, Mokoka M, Moran CN, Sartini Bhreathnach A, MacHale P, Tappuni S, Deering B, Jackson M, McCarthy H, Mellon L, Doyle F, Boland F, Reilly RB, Costello RW. Objective Assessment of Adherence to Inhalers by COPD Patients. *Am J Respir Crit Care Med* **2016**. 10.1164/rccm.201604-0733OC.
- Sundh J**, Janson C, Lisspers K, Stallberg B, Montgomery S. The Dyspnoea, Obstruction, Smoking, Exacerbation (DOSE) index is predictive of mortality in COPD. *Prim Care Respir J*. **2012**. 21(3): 295-301.

Suzuki T, Yanai M, Yamaya M, Satoh-Nakagawa T, Sekizawa K, Ishida S, Sasaki H. Erythromycin and common cold in COPD. *Chest*. **2001**.120:730-3.

Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Diagnosis of pathogens of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. **2007**. 4(8):642-646.

Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV, Cooper J, Sin DD, Mohn WW, Hogg JC. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. **2012**.185(10):1073-80.

Sze MA, Hogg JC, Sin DD. Bacterial microbiome of lungs in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. **2014**. 9:229-38.

Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, McDonough JE, Campbell JD, Brothers JF, Erb-Downward JR, Huffnagle GB, Hayashi S, Elliott WM, Cooper J, Sin DD, Lenburg ME, Spira A, Mohn WW, Hogg JC. Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. **2015**. 192(4):438-45.

T

Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CM, Tudhope SJ, Wedzicha JA, Barnes PJ, Donnelly LE. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J*. **2010**. 35: 1039-1047.

Tian GZ, Zhang LJ, Wang XL, Zhang L, Li SF, Gu CM, Sun J, Cui BY. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in nasopharyngeal swabs by multiplex PCR. *Biomed Environ Sci*. **2012**. 25(3):367–371.

Tian Y, Li Z, Hu W, Ren H, Tian E, Zhao Y, Lu Q, Huang X, Yang P, Li X, Wang X, Kovács AL, Yu L, Zhang H. *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell*. **2010**. 141(6):1042-55.

Turnock AC, Walters EH, Walters JA, Wood-Baker R. Action plans for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. **2005**. CD005074.

Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, Wolfgang MC, Boucher R, Gilpin DF, McDowell A, Elborn JS. Detection of Anaerobic Bacteria in High Numbers in Sputum from Patients with Cystic Fibrosis. *AJRCCM Issues*. **2008**. 177: 9

U

Utokaparch S, Sze MA, Gosselink JV. Respiratory viral detection and small airway inflammation in lung tissue of patients with stable, mild COPD. *COPD*. **2012**. 2:197–203.

Uzun S, Djamin R, Kluytmans J, Mulder P, Van't Veer N, Ermens A, Pelle AJ, Hoogsteden HC, Aerts JG, van der Eerden MM. Azithromycin maintenance treatment in patients with frequent exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COLUMBUS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. **2014**. 2: 361–368.

V

Van der Valk P, Monninkhof E, van der Palen J, Zielhuis G, van Herwaarden C. Effect of discontinuation of inhaled corticosteroids in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the COPE study. *Am J Respir Crit Care Med*. **2002**. 166(10): 1358-63.

Vollenweider DJ, Jarrett H, Steurer-Stey CA, Garcia-Aymerich J, Puhan MA. Antibiotics for exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* **2012**.12:CD010257.

W

Wang X, Mair R, Hatcher C, Theodore MJ, Edmond K, Wu HM, Harcourt BH, Carvalho Mda G, Pimenta F, Nymadawa P, Altantsetseg D, Kirsch M, Satola SW, Cohn A, Messonnier NE, Mayer LW. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR assay to detect *Haemophilus influenzae*. *Int J Med Microbiol*. **2011**. 301(4):303–309

Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009. 9;4(10):e7401.

Wang Z, Bafadhel M, Haldar K, Spivak A, Mayhew D, Miller BE, Tal-Singer R, Johnston SL, Ramsheh MY, Barer MR, Brightling CE, Brown JR. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *Eur Respir J*. **2016**. 47(4):1082-92.

Welte T, Miravittles M, Hernandez P, Eriksson G, Peterson S, Polanowski T, Kessler R. Efficacy and tolerability of budesonide/formoterol added to tiotropium in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. **2009**. 180(8): 741-50.

Wilkinson TM, Patel IS, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA. Airway bacterial load and FEV₁ decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. **2003**.167: 1090-5.

Wilkinson TM, Hurst JR, Perera WR, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA. Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD. *Chest*. **2006**. 129(2):317-324.

Williamson SJ, Yooseph S. From bacterial to microbial ecosystems (metagenomics). *Methods Mol Biol*. **2012**. 804:35-55.

Wilson R, Anzuelo A, Miravittles M, Arvis P, Alder J, Haverstock D, Trajanovic M, Sethi S. Moxifloxacin versus amoxicillin/clavulanate in outpatient acute exacerbations of COPD: MAESTRAL results. *Eur Respir J* .**2012**. 40 (1):17-27.

WHO. World health statistics 2008. Disponible en: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf. **2010**.

Woo PC, Chong KT, Leung K, Que T, Yuen K. Identification of *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim with bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2001**. 40: 125-127.

Wouters EF, Postma DS, Fokkens B, Hop WC, Prins J, Kuipers AF, Pasma HR, Hensing CA, Creutzberg EC; COSMIC (COPD and Seretide: a Multi-Center Intervention and Characterization) Study Group. Withdrawal of fluticasone propionate from combined salmeterol/fluticasone treatment in patients with COPD causes immediate and sustained disease deterioration: a randomised controlled trial. *Thorax*. **2005**. 60(6): 480-7.

Wu D, Hou C, Li Y, Zhao Z, Liu J, Lu X, Shang X, Xin Y. Analysis of the bacterial community in chronic obstructive pulmonary disease sputum samples by denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *BMC Pulm Med.* **2014.** 14:179.

Y

Yamaya M, Azuma A, Tanaka H, Takizawa H, Chida K, Taguchi Y, Mikasa K, Kadota J, Kudoh S. Inhibitory effects of macrolide antibiotics on exacerbations and hospitalization in chronic obstructive pulmonary disease in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Am Geriatr Soc* **2008.** 56:1358–1360.

Yang IA, Clarke MS, Sim EH, Fong KM. Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* **2012.**11:(7):

Yaxier D´A, Capó V, González E, Mederos L, Díaz R. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos de parafina por resina quelante. *Rev Esp Patol.* **2006.** 39(3):171-4

Yoon HI, Lee CH, Kim DK, Park GM, Lee SM, Yim JJ, Kim JY, Lee JH, Lee CT, Chung HS, Kim YW, Han SK, Yoo CG. Efficacy of levofloxacin versus cefuroxime in treating exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* **2013.** 8:329–334.

Z

Zengler K. Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2009.** 73(4): 712-29.

Zwerink M, Brusse-Keizer M, vander Valk PD, Zielhuis GA, Monninkhof EM, van der Palen J, Frith PA, Effing T. Selfmanagement for patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* **2014.** 19(3):CD002990.

