



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Rol de la microbiota en pacientes con bronquiectasias no asociadas a la fibrosis quística

Rubén López Aladid



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

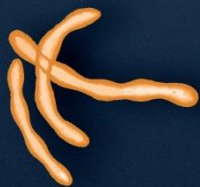
ROL DE LA

MICROBIOTA



**EN PACIENTES CON BRONQUIECTASIAS
NO ASOCIADAS A LA FIBROSIS QUÍSTICA**

RUBÉN LÓPEZ ALADID





Tesis Doctoral

Universidad de Barcelona

**ROL DE LA MICROBIOTA EN PACIENTES
CON BRONQUIECTASIAS NO ASOCIADAS A
FIBROSIS QUÍSTICA**

Memoria de la tesis doctoral presentada por

Rubén López Aladid

Para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Tesis doctoral realizada en el grupo de investigación aplicada en enfermedades respiratorias de IDIBAPS
bajo la dirección del Doctor Antoni Torres Martí y la Doctora Laia Fernández Barat

Tutor:

Francesc Mestres Naval

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorado: Genética

Director de tesis
Dr. Antoni Torres Martí

Codirector de tesis
Dra. Laia Fernández Barat

Tutor
Dr. Francesc Mestres Naval

Autor: Ruben Lopez Aladid

Barcelona, Julio 2022

“La inteligencia es la habilidad de adaptarse a los cambios”. “Solo somos una raza avanzada de primates en un planeta menor de una estrella ordinaria.”

Stephen Hawking

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis lleva detrás un enorme trabajo de formación investigadora apoyado por mis directores de tesis y por la inversión de muchas horas de trabajo duro y gratificante que me ha permitido aprender herramientas experimentales y bioinformáticas que van a ser determinantes en el resto de mi carrera científica.

Quiero agradecer a mis directores de tesis Dr. Antoni Torres Martí y la Dra. Laia Fernández Barat esta oportunidad que me han brindado para evolucionar en mi carrera científica. Gracias por la confianza depositada en mí durante estos años dentro y fuera de esta tesis, para realizar y redactar proyectos que me han permitido madurar como científico. Gracias por la paciencia y la comprensión en los momentos difíciles donde siempre me he sentido respaldado por ellos y respetado.

No hay palabras para describir la buena predisposición que han tenido para que finalice esta tesis y de un paso más allá en mi carrera científica la cual espero que pueda seguir compartiendo de la mano de estos dos grandes profesionales.

Agradecer a todos mis compañeros de laboratorio que me han apoyado durante el transcurso de esta tesis, así como a los clínicos del grupo que han confiado en mí para realizar proyectos conjuntos relacionados con microbioma. Agradezco también a Elisabeth Sancho todas las gestiones administrativas que me ha ayudado a resolver y a Leticia por apoyarme y ayudarme en los estudios asociados a esta línea de investigación del grupo. Gracias a Alba por su ayuda con la ilustración de la portada de esta tesis.

Gracias a todos los y las miembros de la plataforma de genómica de IDIBAPS por su apoyo y sus servicios y asesoramiento en el ámbito de la secuenciación masiva.

Gracias a mi tutor por estar siempre dispuesto a ayudarme y facilitarme las cosas. Gracias también por su proximidad que me ha hecho sentir siempre muy apoyado en esta tesis.

Gracias a GenomixCoders S.L (Roque i Marc) por toda la apasionante aventura que me habéis hecho vivir y las que nos quedan aún por el camino.

Gracias Yvonne por aguantar todos mis fines de semana y noches volcado en la investigación, sin ti hubiese sido un camino mucho más largo y empedrado. La mejor

compañera de vida que podría tener. Gracias por tus consejos, tu amor incondicional y tu increíble apoyo.

SINOPSIS

El pulmón siempre se ha considerado estéril. Sin embargo, el campo de la microbiota pulmonar se ha visto revolucionado por el avance de las técnicas moleculares. Cada individuo tiene un perfil de microbiota único, definido como el conjunto de microorganismos presentes en un ambiente establecido, que ha coevolucionado con el huésped y coloniza sus tejidos mucosos, formando una relación mutualista y simbiótica. El término microbioma se utiliza para describir todo el hábitat, que incluye los microorganismos, sus genomas y las condiciones ambientales circundantes.

La microbiota pulmonar es escasa, crece en un ambiente pobre en nutrientes y está en constante renovación, debido a la función pulmonar (tos, aclaramiento mucociliar, mecanismo de defensa del huésped) y la migración desde el tracto respiratorio superior y la dispersión de la mucosa. Además, la edad, la genética y el entorno contribuyen a la variabilidad individual y la constante evolución a lo largo de la vida. Los principales filos en pulmones sanos son *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que a nivel de género predominan *Streptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella*, esta última con menor contribución en el desarrollo, progresión y agudizaciones de las enfermedades pulmonares. De hecho, la estructura alterada del pulmón, el curso de la enfermedad y los tratamientos crónicos pueden desencadenar cambios en la microbiota pulmonar, lo que lleva a desequilibrios en la comunidad microbiana, también conocida como disbiosis.

En este trabajo se ha estudiado en primer lugar cual era la combinación de regiones hipervariables del gen *16S rRNA* ribosomal (V1V2, V3V4, V5V7, V7V9) con mayor sensibilidad y especificidad respecto a la identificación taxonómica en muestras de esputo. Se utilizó un control estándar de microbiota comercial para validar los resultados. Nuestro estudio confirma que cada región hipervariable *16S rRNA* proporciona diferencias significativas en la identificación taxonómica en el esputo. En particular, nuestros resultados sugieren que V1V2 en lugar de V3V4 exhibe un mayor poder de resolución para la identificación de taxonomía. Por lo tanto, las plataformas de secuenciación de tercera generación de *16S rRNA* de longitud completa están más disponibles y mejoran las tasas de error, V1V2 se puede usar para la identificación taxonómica en el esputo. El hallazgo puede permitir en futuros trabajos de microbiota

respiratoria utilizar las regiones adecuadas para evitar sesgos en la información taxonómica resultante de estos.

Una vez obtenida esta aproximación metodológica se ha demostrado que la alta carga bacteriana de *P. aeruginosa* se asocia con la aparición de un patobioma. Los resultados demuestran una asociación significativa entre la presencia de una alta carga de *P. aeruginosa* y la disminución de la diversidad, abundancia y variabilidad de la flora concomitante, posicionando la agrupación de la carga de *P. aeruginosa* como un biomarcador microbiano potencial en pacientes con bronquiectasias. Estos hallazgos brindan la base para extrapolar el estado del microbioma según la carga de *P. aeruginosa* mediante cultivos estándares en la rutina de la microbiología clínica y comprender mejor la gravedad del paciente no tan solo según el patógeno sino según la disbiosis que comporta el patógeno *per se*. Una vez encontrado este patobioma según la carga bacteriana de *P. aeruginosa* en la etapa final de este estudio se hipotetizó si clusterizando por fenotipo de *P. aeruginosa* (mucoide y no mucoide) encontraríamos el establecimiento de un patobioma. El fenotipo mucoide es típico de los biofilms bacterianos y se asocia a la colonización crónica. Los hallazgos fueron exitosos en relación con la hipótesis dado que, según el fenotipo, así como según la carga bacteriana anteriormente demostrada, se encontró un patobioma en pacientes con el fenotipo mucoide. El presente estudio nos ha permitido encontrar la región hipervariable más resolutive para muestras de esputo, identificar el patobioma y como consecuencia la gravedad del paciente por la disbiosis provocada por este patobioma según la carga bacteriana y según el fenotipo de *P. aeruginosa*.

ABSTRACT

The lung has always been considered sterile. However, the field of lung microbiota has been revolutionized by the advance of molecular techniques. Each individual has a unique microbiota profile, defined as the assemblage of microorganisms present in an established environment, that has coevolved with the host and colonizes its mucosal tissues, forming a mutualistic and symbiotic relationship. The term microbiome is used to describe the entire habitat, that includes the microorganisms, their genomes and the surrounding environmental conditions.

The lung microbiota is scarce, it grows in a nutrient poor environment, and it is in constant turnover, due to pulmonary function (cough, mucociliary clearance, host defense mechanism) and migration from the upper respiratory tract and mucose dispersion. Moreover, the age, genetics and environment contribute to the individual variability and the constant evolution through life. The main phyla in healthy lungs are *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, while at the genus level *Streptococcus*, *Prevotella* and *Veillonella* predominate, with lesser contributions from *Haemophilus* and *Neisseria*. Besides, evidence is growing about the colonization of virus and fungi in the respiratory tract of both healthy and ill individuals. The airway microbiota plays a crucial role in the development, progression and exacerbation of lung diseases. Indeed, the altered structure of the lung, the disease course and the chronic treatments may trigger changes in regional growth conditions, leading to imbalances in the microbial community, also known as dysbiosis.

In this work, we have studied, in the first place, which was the combination of hypervariable regions of the bacterial ribosomal *16S rRNA* that allows a greater power of taxonomic identification with respect to the others in sputum samples. Our study confirms that each *16S rRNA* hypervariable region provides significant differences in taxonomic identification.. Notably, our results suggest that V1V2 rather than V3V4 exhibits higher resolving power for sputum taxonomy identification. Therefore, meanwhile, full-length *16S rRNA* third-generation sequencing platforms become more widely available and improve error rates, V1V2 can be used for taxonomic identification in sputum as it has the most resolving power. high among the other hypervariables regions.

The finding may allow future respiratory microbiota studies to use the appropriate regions to avoid bias in the resulting taxonomic information.

Once this methodological finding was obtained, it has been shown that the high bacterial load of *P. aeruginosa* is associated with the appearance of a pathobiome. The results demonstrate a significant association between the presence of a high *P. aeruginosa* load and decreased diversity, abundance, and variability of the concomitant flora, positioning *P. aeruginosa* load clustering as a potential microbial biomarker in patients with bronchiectasis. These findings provide the basis to extrapolate the state of the microbiome according to *P. aeruginosa* load using standard cultures in routine clinical microbiology and to better understand the severity of the patient not only according to the pathogen but also according to the dysbiosis caused by the pathogen per se. Once this pathobiome was found according to the bacterial load of *P. aeruginosa* in the final stage of this study, it was hypothesized whether, by culturing by *P. aeruginosa* phenotype (mucoid and non-mucoid), we would find the establishment of a pathobiome. The findings were successful in relation to the hypothesis since according to the phenotype, as well as according to the previously demonstrated bacterial load, a pathobiome was found in patients with the mucoid phenotype. The present study has allowed us to find the most resolving hypervariable region for sputum samples, identify the pathobiome and, consequently, the severity of the patient due to the dysbiosis caused by this pathobiome according to the *P. aeruginosa* load and according to the *P. aeruginosa* phenotype.

ABREVIATURAS

16S rRNA: RNA ribosomal de la subunidad ribosomal bacteriana del 16S

BQ: Bronquiectasias

BSI: Bronchiectasis Severity Index

BTS: British Thoracic Society

FQ: Fibrosis Quística

IC: Intervalo de Confianza

PA: *Pseudomonas aeruginosa*

TAC: Tomografía Axial Computarizada

TACAR: Tomografía Axial Computada de Alta Resolución

FEV₁: Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo

NGS: next-generation sequencing

CONS: coagulase-negative *Staphylococcus* species

SOC: standard of care

ROC curve: receiver operating characteristic curve

AUC: area under the curve

PCoA: principal coordinates analysis

LDA: linear discriminant analysis

NMDS: non-metric multidimensional scaling

PCR: polymerase chain reaction

LEfse: linear discriminant analysis effect size

NMDS: non-metric multidimensional scale

BAI: infecciones asociadas a biopelículas

**Se ha considerado para esta tesis presentar algunas abreviaturas en inglés debido a que son tecnicismos que se utilizan en este idioma como estándares en los estudios científicos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 DEFINICIÓN DE LAS BRONQUIECTASIAS	16
1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y PREVALENCIA	17
1.3 FISIOPATOLOGÍA	19
1.4 ETIOLOGÍA	20
1.4.1 Causas de la etiología	21
1.4.1.1 Infecciones primarias	21
1.4.1.2 Obstrucción de las vías respiratorias	22
1.4.1.3 Fibrosis quística (FQ) y síndrome joven (Young Syndrome)	22
1.4.1.4 Deterioro de las defensas del huésped	22
1.4.1.5 Enfermedades sistémicas	23
1.4.1.6 Tabaquismo y enfermedad obstructiva crónica pulmonar (EPOC)	24
1.4.1.7 Los defectos anatómicos congénitos	24
1.5 ETIOLOGIA MICROBIANA	24
1.5.1 Infecciones intermitentes versus crónicas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
1.5.2 Implicaciones de las biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
1.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y SÍNTOMAS	29
1.7 OUTCOMES CLÍNICOS	30
1.7.1 Morbi-mortalidad y complicaciones	30
1.7.2 Sistemas de puntuación	31
1.7.3 Otros predictores de pronóstico	32
1.7.4 Calidad de vida	32
1.7.5 Carga económica	33
1.8 EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA	34
1.8.1 Pruebas de laboratorio	34
1.8.2 Diagnóstico por imágenes	36
1.8.3 Tipos de Bronquiectasias	40
1.8.3.1 Bronquiectasias difusas	40
	12

1.8.3.2 Bronquiectasias focal	41
1.8.4 Pruebas de función pulmonar	41
1.8.5 Diagnóstico diferencial	42
1.9 TRATAMIENTO	42
1.9.1 Medidas generales	43
1.9.2 Terapia con antibióticos	43
1.9.3 Tratamiento de las agudizaciones	44
1.9.4 Otras terapias médicas	45
1.9.5 Enfermedad avanzada	45
1.9.6 Opciones de tratamiento recomendadas por las Guidelines	46
1.9.6.1 Terapia de erradicación e infección bronquial	46
1.9.6.2 Tratamiento en agudizaciones	47
2.1. ANÁLISIS GENÓMICO DEL <i>16S rRNA</i>	49
2.1.1 TECNOLOGÍAS Next Generation Sequencing (NGS)	49
2.1.2 Análisis bioinformático	53
2.2. CONCEPTO DE BIODIVERSIDAD	55
2.2.1 Diversidad Alfa(α)	56
2.2.2 Beta diversidad (β)	57
2.2.3 Gamma diversidad (γ)	59
5.2.4 Inferencia metabólica en base a la diversidad microbiana	60
2.3 DEFINICIÓN DEL MICROBIOMA Y LA MICROBIOTA	62
3.4 DEFINICIÓN DE DISBIOSIS	63
2.5 MICROBIOMA RESPIRATORIO	63
2.6 DISBIOSIS PULMONAR EN EPOC	72
2.6.1 EPOC estable	72
2.6.2 Eventos agudos	74
2.8 MICROBIOMA BRONQUIECTASIAS-EPOC (BQO)	75
2.9 DIFERENCIAS EN LOS MICROBIOMAS BQ-EPOC	76
3.1 HIPOTESIS	79
3.2 OBJETIVOS	80
4. MATERIALES Y METODOS	82
4.1 Materiales y métodos comunes de los tres estudios.	82
4.2 Materiales y métodos estudio 1: Regiones hipervariables de <i>16S rRNA</i> con el mayor poder de resolución para la identificación taxonómica en esputo.	86
	13

4.3 Materiales y métodos estudio 2: La identificación del patobioma agrupado por carga de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en pacientes con bronquiectasias	87
4.4 Materiales y métodos estudio 3: El patobioma en el fenotipo Mucoide de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	88
5. RESULTADOS	92
5.1 Resultados estudio 1: Regiones hipervariables de 16S rRNA con el mayor poder de resolución para la identificación taxonómica en esputo	92
5.2 Resultados Estudio 2. La identificación del patobioma agrupado por carga de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en pacientes con bronquiectasias	103
5.3 Resultados Estudio 3: El patobioma en el fenotipo Mucoide de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	110
6. DISCUSION	120
7. CONCLUSIONES	132
8. BIBLIOGRAFIA	135
9. ANEXOS	148
ANEXO 1. Repositorio Github de los “pipelines” bioinformáticos utilizados en esta tesis.	148
ANEXO 2. AYUDAS PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL	148
ANEXO 3. Publicaciones realizadas no directamente vinculadas a la tesis.	148
ANEXO 4. Patente desarrollada en paralelo durante la realización de la tesis doctoral: patente de anticuerpo monoclonal anti-Sars-CoV-2.	150

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN DE LAS BRONQUIECTASIAS

Las bronquiectasias (BQ) son un trastorno respiratorio adquirido crónico, caracterizado por una destrucción progresiva e irreversible de la pared y una dilatación de las vías respiratorias de los bronquios y bronquiolos principales como se muestra en la Figura 1 (1).

Hay múltiples condiciones que están asociadas con el desarrollo de bronquiectasias, pero para que la enfermedad se manifieste se requiere de la combinación de una agresión infecciosa con un deterioro de las defensas del huésped. En este sentido, numerosas etiologías pueden contribuir a la fisiopatología, siendo las infecciones pulmonares, la falta de defensas del huésped y las condiciones congénitas las más importantes. Clínicamente, la tos crónica y la producción diaria de esputo mucopurulento representan los principales síntomas. Durante el curso de la enfermedad, los pacientes pueden experimentar agudizaciones agudas asociadas con un aumento de la inflamación y la progresión del daño pulmonar(1).

El diagnóstico de bronquiectasias puede sospecharse con base en las características clínicas y radiográficas de tórax y puede estar orientado según la etiología sospechada por el clínico. La tomografía computarizada es la prueba estándar de referencia (“Gold Standard”) para el diagnóstico, ya que detecta cambios estructurales característicos asociados con la enfermedad(2).

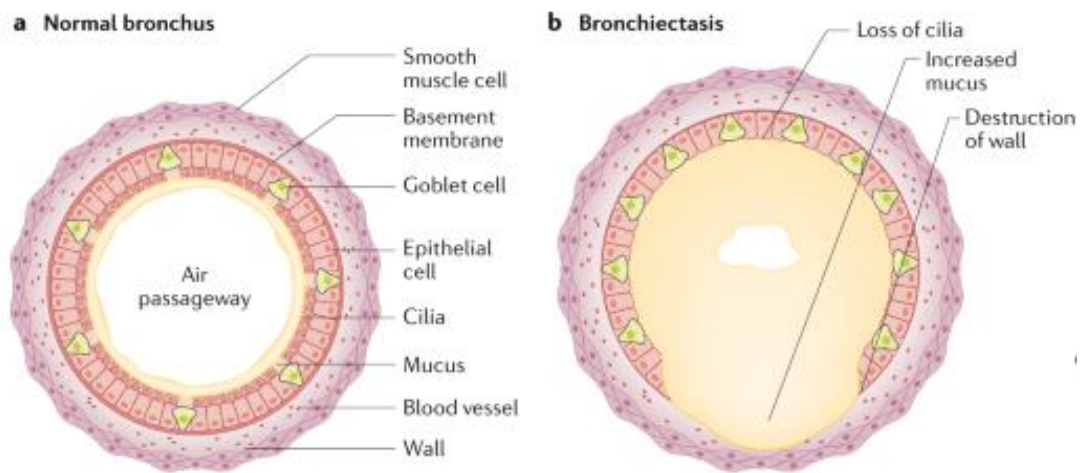


Figura 1. Representación de Bronquiectasia. Bronquio normal (figura 1a) y bronquiectasia (figura 1b). En la bronquiectasia aumenta la producción y/o acumulación de moco, las células ciliadas están destruidas o dañadas y algunas zonas de la pared bronquial permanecen en una inflamación crónica y agrandada. *Imagen adaptada de Chalmers, J.D., Chang, A.B., Chotirmall, S.H. et al. Bronchiectasis. Nat Rev Dis Primers 4, 45 (2018).*

El tratamiento se basa en los principios de prevenir las agudizaciones, detener la progresión de la enfermedad, reducir los síntomas y mejorar la calidad de vida. Los antibióticos seleccionados están indicados como terapia de prevención y durante las agudizaciones. El pronóstico de las bronquiectasias depende del proceso patológico, la frecuencia de las agudizaciones y las comorbilidades del paciente. Los sistemas de puntuación tienen como objetivo identificar las agudizaciones frecuentes y los cuestionarios pueden ayudar a evaluar la calidad de vida desde la perspectiva del paciente(3).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y PREVALENCIA

La prevalencia de bronquiectasias está aumentando en la actualidad, debido al envejecimiento, la mayor prevalencia de enfermedades e infecciones pulmonares crónicas y la mejora de la imagen diagnóstica, como la tomografía computarizada de alta resolución. En Cataluña, se ha estimado en 36,2 casos por 10.000 habitantes(4). La

prevalencia aumenta con la edad con una diferencia de 8 a 10 veces en la prevalencia después de los 60 años. Curiosamente, las diferencias entre los grupos de edad reflejan las diferencias en la prevalencia de las causas subyacentes de la bronquiectasia, como la enfermedad pulmonar o las infecciones crónicas como se muestra en la Figura 2 (5). La bronquiectasia también parece ser más común y virulenta en el género femenino (6).

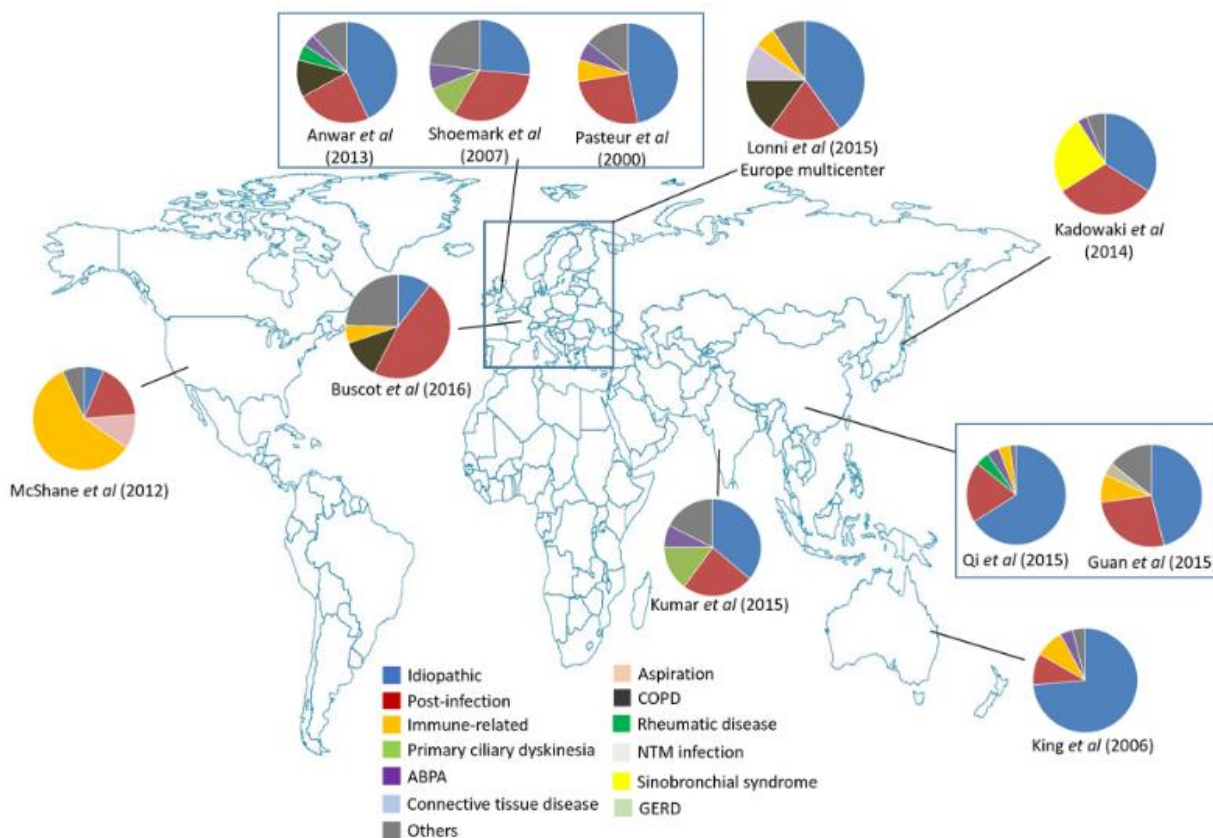


Figura 2. Etiologías predominantes en diferentes regiones geográficas y poblaciones étnicas. Los gráficos circulares individuales indican las principales etiologías. (top 4 o 5) en cada cohorte. Abreviaturas: ABPA - Aspergilosis broncopulmonar alérgica, EPOC - Trastorno pulmonar obstructivo crónico, NTM - Micobacterias no tuberculosas, ERGE - Enfermedad por reflujo gastroesofágico. *Imagen adaptada de Chandrasekaran et al. BMC Pulmonary Medicine (2018) 18:83*

La bronquiectasia (BQ) es una enfermedad respiratoria inflamatoria crónica caracterizada por infección recurrente, inflamación, y una dilatación permanente de la pared bronquial, que resulta en agudizaciones frecuentes (7). La prevalencia de las BQ está asociada con la edad por lo que, es más grave y se asocia con peores resultados en cohortes de edad avanzada que en las cohortes más jóvenes (8). Las BQ a menudo surgen después de una

infección, pero en muchos casos, esta etiología no está clara (9)

1.3 FISIOPATOLOGÍA

Principalmente dos componentes se asocian con la inducción de bronquiectasias: una agresión infecciosa y una respuesta relacionada con el huésped, que pueden incluir deterioro del drenaje, obstrucción de las vías respiratorias y / o defecto en la defensa del huésped. La respuesta inflamatoria como consecuencia de la agresión infecciosa, crea un debilitamiento o destrucción de los componentes musculares y elásticos de las paredes bronquiales, dando lugar a la ya mencionada dilatación anormal de los bronquios proximales y medianos (diámetro > 2 mm), característica de las bronquiectasias (10). En el artículo de Chalmers et al., mostraron que los pacientes con bronquiectasias presentan un aumento en la abundancia de neutrófilos pulmonares relacionado con una disminución de la apoptosis, una reducción de la fagocitosis y una alteración de la destrucción de bacterias(10). Los neutrófilos están relacionados con una mayor liberación de mieloperoxidasa y elastasa, que dañan el componente muscular y elástico de la pared bronquial. Este aumento de células efectoras inmunes con predominio de neutrófilos, vinculado con la liberación de citocinas inflamatorias, genera inflamación transmural, edema mucoso, cráteres, ulceración y neovascularización en las vías respiratorias con rápida destrucción de las vías respiratorias (10,11).

Otro factor que contribuye a la fisiopatología de las bronquiectasias es el deterioro del aclaramiento mucociliar, debido a alteraciones en la estructura pulmonar, deshidratación de las vías respiratorias, exceso de volumen y viscosidad de moco (12).

El aclaramiento deficiente de las secreciones favorece colonización e infección con microorganismos patógenos, lo que da como resultado un ciclo de mayor daño y dilatación bronquial, aclaramiento deficiente de las secreciones, infección recurrente y

más daño bronquial. Esto se conoce como la “hipótesis del círculo vicioso” de Cole y se acepta como el paradigma del desarrollo y la progresión de las bronquiectasias representado en la Figura 4. El punto de entrada que desencadenará el ciclo depende de la causa subyacente de la bronquiectasia: aumento de la inflamación, deterioro de las defensas del huésped, daño pulmonar directo (13,14).

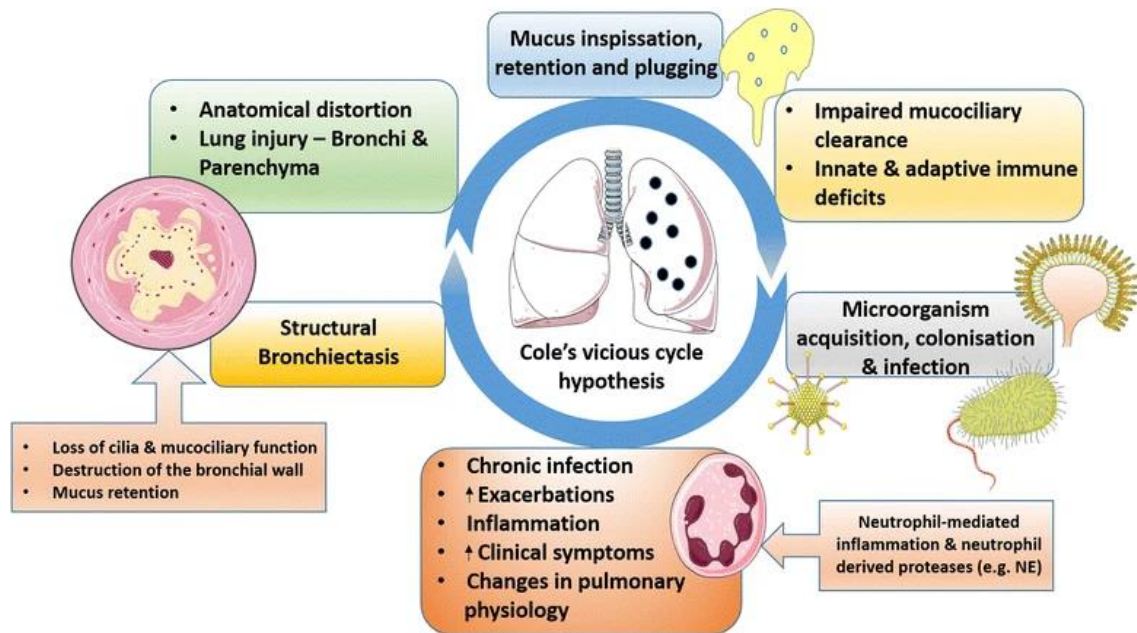


Figura 3. Una interpretación moderna de la hipótesis del círculo vicioso de Cole. Abreviaturas: NE - Elastasa de neutrófilos, ↑ - Aumento. *Imagen adaptada de Chandrasekaran, R., Mac Aogáin, M., Chalmers, J.D. et al. Geographic variation in the aetiology, epidemiology and microbiology of bronchiectasis. BMC Pulm Med 18, 83 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0638-0>*

1.4 ETIOLOGÍA

Son múltiples las etiologías que pueden inducir o contribuir a la fisiopatología de las bronquiectasias. Un informe de la Red Europea de Bronquiectasias (EMBARC) identificó una causa subyacente de bronquiectasias entre el 60% de todos los pacientes incluidos: los más frecuentes fueron post-infecciosos (20%), enfermedad pulmonar subyacente (EPOC, 15%), trastornos reumáticos (10%) e inmunodeficiencia (6%) (10,15). En niños y adolescentes, la etiología subyacente se identifica con mayor frecuencia, siendo

la inmunodeficiencia (primaria y secundaria), aspiración / cuerpo extraño y disquinesia ciliar son las condiciones más frecuentes (16). Las bronquiectasias pueden ser: Difusa (afecta muchas áreas de los pulmones) o Focal (aparece en solo 1 o 2 áreas pulmonares).

1.4.1 Causas de la etiología

Las múltiples etiologías se relacionan con: a) Infecciones primarias, b) Obstrucción de las vías respiratorias, c) Fibrosis quística (FQ) y síndrome joven (Young Syndrome), d) Deterioro de las defensas del huésped, e) Enfermedades sistémicas, f) Tabaquismo y enfermedad obstructiva crónica pulmonar (EPOC) y g) Los defectos anatómicos congénitos.

1.4.1.1 Infecciones primarias

El desarrollo de bronquiectasias se asocia con una gran variedad de infecciones pulmonares bacterianas, micobacterianas y virales. Las infecciones pulmonares infantiles por *Haemophilus influenzae* (bronquitis bacteriana) y *Bordetella pertussis* (tos ferina) parecen estar implicadas en la fisiopatología de la enfermedad. Las infecciones por micobacterias (como la tuberculosis) pueden causar como secuela una lesión tisular que predispone a la colonización bacteriana. Las bronquiectasias relacionadas con la infección primaria por micobacterias no tuberculosas (NTM) pueden aparecer tanto en pulmones previamente dañados (enfisema) como en huéspedes sanos, inmunocompetentes o no (SIDA) (17).

La aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) representa una reacción hiperinmune a *Aspergillus*, que debe sospecharse en pacientes con una larga historia de asma resistente al tratamiento, asociada a tos productiva con esputo mucopurulento. En este caso, el daño pulmonar es secundario a la obstrucción de las vías respiratorias por secreciones viscosas que contienen *Aspergillus* (18).

1.4.1.2 Obstrucción de las vías respiratorias

La obstrucción bronquial puede ser causada por la aspiración de un cuerpo extraño, lesiones obstructivas intraluminales (como un tumor carcinoide) o compresión extraluminal (por ejemplo, ganglios linfáticos). En los adultos, la aspiración se asocia a un estado alterado de conciencia: en estos pacientes, el cuerpo extraño genera una neumonía post obstructiva que puede predisponer a bronquiectasias si la terapia se retrasa o es ineficaz, o el paciente presenta un mal estado nutricional.

1.4.1.3 Fibrosis quística (FQ) y síndrome joven (Young Syndrome)

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva causada por una disfunción de los canales de sodio y cloruro de las vías respiratorias, debido a una variante heterocigota del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*). Estas alteraciones provocan taponamiento mucoso de las vías respiratorias proximales e infección pulmonar crónica, especialmente con *PAmucoide*, que predispone a la inflamación pulmonar. La sinusitis y las bronquiectasias son las principales manifestaciones respiratorias de la FQ, pero la enfermedad también se asocia con alteraciones del páncreas, riñón, hígado e intestino (19,20).

El síndrome de Young es menos prevalente pero bastante similar a la FQ, ya que incluye bronquiectasias, sinusitis y azoospermia obstructiva, sin evidencia de los otros hallazgos de fibrosis quística.

1.4.1.4 Deterioro de las defensas del huésped

Las defensas del huésped defectuosas pueden ser locales o sistémicas. La discinesia ciliar es parte del deterioro local de la defensa del huésped, ya que conduce a un aclaramiento mucociliar deficiente, infecciones pulmonares recurrentes y, en última instancia, bronquiectasias. Esta disfunción ciliar puede estar asociada a enfermedades sistémicas,

como el síndrome de Kartagener (situs inversus, sinusitis, bronquiectasias), poliquistosis renal autosómica dominante, debido a cilios defectuosos y expresión de proteínas ciliar (policistina-1 y policistina-2), o deficiencia de alfa-1 antitripsina, ya que predispone al enfisema (21).

Sobre defensas sistémicas defectuosas, estados de inmunosupresión congénita o adquirida como la hipogammaglobulinemia, el SIDA, el trasplante de órganos o el tratamiento de trastornos reumatoides (entre otros) pueden contribuir a las bronquiectasias, ya que las infecciones repetidas conducen a una lesión de la pared bronquial.

1.4.1.5 Enfermedades sistémicas

La artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren, son dos enfermedades reumáticas, que pueden complicarse con las bronquiectasias. En la artritis reumatoide se desconoce el mecanismo, pero los estudios muestran una mayor prevalencia de pacientes con bronquiectasias con alelos *CFTR* anormales en comparación con el mismo grupo de pacientes sin bronquiectasias. (22,23) En el síndrome de Sjögren, puede ser secundario a un aumento de la viscosidad del moco que conduce a un aclaramiento deficiente de las vías respiratorias.(24)

La evidencia emergente muestra que el reflujo gastroesofágico y las bronquiectasias pueden estar asociados. El papel de las pruebas de diagnóstico (*H. pylori*, monitorización del pH, manometría, endoscopia superior) es incierto, pero la supresión del ácido gástrico puede ser útil en estos pacientes (25).

También se ha observado que las bronquiectasias aparecen en asociación con la enfermedad inflamatoria intestinal, pero la etiología sigue sin estar clara . Futuros estudios en el microbioma intestinal y el eje intestino-pulmón pueden aclarar si la

translocación bacteriana del intestino al pulmón es una de las causantes de las bronquiectasias.

1.4.1.6 Tabaquismo y enfermedad obstructiva crónica pulmonar (EPOC)

No se ha demostrado directamente el papel causal del tabaquismo en la bronquiectasia. Sin embargo, está relacionada con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y, por lo tanto, puede ser parte de su fisiopatología, ya que la EPOC se asocia con agudizaciones o infecciones repetidas que pueden empeorar la función pulmonar y acelerar la progresión de la enfermedad (26).

1.4.1.7 Los defectos anatómicos congénitos

En las vías respiratorias pueden provocar bronquiectasias a través de un aclaramiento deficiente de las secreciones respiratorias e infecciones recurrentes. Entre otros, podemos citar traqueomalacia, síndrome de Williams-Campbell (deficiencia de cartílago en bronquios de 4° a 6° orden), broncomalacia y traqueobroncomegalia.

1.5 ETIOLOGIA MICROBIANA

La agudización de las bronquiectasias se define como un deterioro clínico que dura al menos 48 horas, excluidas otras causas potenciales, que conduce a un cambio en el tratamiento de las bronquiectasias. Según EMBARC, aproximadamente el 50% de los pacientes europeos con bronquiectasias tienen dos o más agudizaciones por año y un tercio requiere al menos una hospitalización por año (27).

Clínicamente, la agudización, se caracteriza por el deterioro de tres o más de los siguientes síntomas: tos, volumen y / o consistencia del esputo, purulencia del esputo, disnea y / o tolerancia al ejercicio, fatiga, hemoptisis. La fiebre también puede aparecer

durante el episodio (28).

El proceso fisiopatológico se basa en los mismos componentes descritos anteriormente en “Fisiopatología” (defensas pulmonares deterioradas, respuesta inflamatoria, daño de las vías respiratorias e infección): las agudizaciones son eventos agudos que pueden acelerar el hipotético “círculo vicioso”. Entre las causas infecciosas, se ha reconocido que la infección bacteriana es crucial en el desarrollo de agudizaciones. Sin embargo, hay una falta de evidencia del impacto de virus y hongos como factores desencadenantes. Otros factores han sido poco esclarecidos (29).

Las bacterias más comunes en las vías respiratorias de pacientes con BQ son *Pseudomonas aeruginosa* (PA) y *Haemophilus influenzae* (30,31). Sin embargo, la PA es más frecuente en adultos mayores que en niños (31) y se asocia con un deterioro pulmonar función, colonización polimicrobiana (32) y agudizaciones con mayor hospitalización, lo que sugiere que se trata de un marcador de severidad (32,33).

Actualmente se utilizan cultivos estándar o “Standard Of Care” (SOC) para examinar muestras de las vías respiratorias. Siguiendo los SOC en las agudizaciones en comparación con BQ estable la etiología predominante es *H. influenzae* (14-47% de los casos), PA (5-31%) y *Streptococcus pneumoniae* (2-14%) como los patógenos aislados con mayor frecuencia (34–37). Curiosamente, Tunney et al han descrito la composición de la microbiota pulmonar en pacientes con BQ utilizando cultivo anaeróbico y secuenciación de rRNA 16S, y han concluido que la composición de la microbiota permanece estable durante las agudizaciones y su tratamiento, lo que sugiere que esto no es un detonante (38). Por el contrario, Menéndez *et al.* analizaron el perfil inflamatorio sistémico durante y después de BQ agudización y encontraron una mayor inflamación (interleucina [IL] -17a) en pacientes con enfermedades crónicas y aislamiento agudo de

PA durante las agudizaciones graves. Concluyeron que IL-17a puede ser monitoreada para pronosticar la elevada inflamación (39). La PA es una bacteria clave a la hora de definir fenotipos clínicos en BQ. Después de analizar las características clínicas y biológicas de 1.145 pacientes en cinco bases de datos en Europa, Aliberti *et al.* identificaron cuatro fenotipos clínicos: infección por PA (16%), otra infección crónica (24%), esputo diario; sin infección crónica siendo todos fumadores o exfumadores, (33%) y BQ seco sin esputo; siendo este el más leve (27%) (40). Identificaron que el “clúster” de infección por PA era el que se asocia a mayor severidad y peor pronóstico. Otro estudio español de 485 pacientes con BQ identificó cuatro grupos de pacientes con características clínicas similares; uno de estos grupos presentó obstrucción severa de la vía aérea, alto riesgo de agudización y, nuevamente, infección crónica bronquial por PA (41). Dada la relación entre PA con la peor evolución clínica de los pacientes con BQ su detección precoz es esencial para mejorar el manejo clínico del paciente.

1.5.1 Infecciones intermitentes versus crónicas por *Pseudomonas aeruginosa*

La primera definición de infección respiratoria crónica con PA se introdujo en el centro danés de fibrosis quística en 1974. Esto se basó en un examen microbiológico mensual de esputo, definiendo la infección crónica por PA como su presencia en dicho esputo durante 6 meses e infección durante períodos intermitentes(39) Más tarde, estas definiciones fueron modificadas, agregando que la infección crónica requería que PA estuviese presente en las vías respiratorias inferiores durante 6 meses y un elevado número de precipitinas durante este tiempo (42). No existe una definición consensuada de infección crónica por PA en BQ. De hecho, de los estudios anteriores sobre ese tema, solo Evans *et al.* utilizaron cultivos consecutivos para definir la colonización crónica de PA (43,44) Basado en la literatura reciente, la ERS definió la infección respiratoria

crónica para estudios de BQ como 2 aislados de PA en muestras respiratorias con 3 meses de diferencia en 1 año (45,46). Es importante destacar que hay una escasez de estudios de seguimientos longitudinales que examinan cultivos de microbiología. Además, los niveles de anticuerpos sistémicos contra PA utilizados sistemáticamente como marcadores de enfermedad crónica en la FQ no se utilizan de forma rutinaria para el diagnóstico de PA en BQ. Como consecuencia actualmente es difícil tener una comprensión realista de las implicaciones en los resultados clínicos de la infección crónica por PA en BQ.

La literatura actual sugiere que la colonización crónica por PA está presente en el 12-27% de los pacientes con BQ o BQ-EPOC, (45-47) y que su presencia se asocia a un peor pronóstico (46). No obstante, se necesitan más pruebas para determinar si el actual proceso de diagnóstico microbiano, que es el primer paso en el manejo de una infección por PA, es lo suficientemente sensible como para dar una imagen precisa de la frecuencia PA en BQ (48). Para una identificación adecuada se deberían medir los niveles de anticuerpos contra PA, las implicaciones de las biopelículas de PA y problemas relacionados con la disbiosis del microbioma. Dicha integración podría ayudarnos a alcanzar un concepto más holístico de la verdadera fisiopatología y las implicaciones de la infección crónica por PA en BQ (49-51). La detección precoz de PA seguido de un tratamiento adecuado podría reducir potencialmente la infección crónica por PA en BQ y mejorar el pronóstico.

La erradicación de la colonización crónica ha sido demostrada solo en las primeras etapas de la infección (47-52). El tratamiento antimicrobiano adecuado ciertamente reduce la carga bacteriana y número de agudizaciones mientras mejora función pulmonar y calidad de vida; sin embargo, varios estudios han demostrado que, usando “Whole Genome

Sequence” (WGS) para la secuenciación de todo el genoma, la PA persiste en el 50% de los casos en los que se ha informado de erradicación con éxito (53,54).

1.5.2 Implicaciones de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*

PA es un bacilo gramnegativo oportunista que puede cambiar de una forma planctónica a una forma sésil en la que crece en agregados conocidos como biopelículas, el proceso está descrito en la Figura 3 (55). La formación de una biopelícula es una antigua estrategia de supervivencia de las bacterias que se produce cuando se enfrentan a estrés ambiental, como el ejercido por el uso sostenido de antimicrobianos, residuos inflamatorios, y disponibilidad variable de nutrientes (56). Estos factores pueden inducir mutaciones en el gen *mucA* favoreciendo el exceso de producción de alginato, una característica de PA implicada en la formación de biopelículas.

Las duras condiciones ambientales experimentadas por las bacterias más expuestas en la superficie de la biopelícula no son compartidas por aquellas que se encuentran su interior. Así, los gradientes ambientales dan forma a las peculiaridades de cada bacteria en la comunidad. El crecimiento de biopelículas se asocia con el metabolismo de las bacterias, llevando a las células bacterianas a un estado latente son las llamadas "células persistentes" que no se dividen y son altamente tolerantes a los antimicrobianos (57). Debido a estas características intrínsecas, las infecciones asociadas a biopelículas (BAI) son difíciles de diagnosticar, tratar y erradicar (58), la sobreproducción de alginato asociada a las biopelículas, y el desarrollo de células persistentes no solo confiere protección contra los antimicrobianos y la respuesta inmune del huésped, sino que también provocan falsos negativos en los cultivos microbiológicos. Por lo tanto, las BAI puede fácilmente eludir el principal mecanismo de defensa humana contra la infección y confundir los resultados del diagnóstico convencional con falsos negativos. Ha habido

muy pocos estudios sobre la presencia de biopelículas de PA en pacientes con BQ (59). Esto contrasta con la infección respiratoria crónica en pacientes con FQ, para la cual existe evidencia científica sólida que respalda el papel de las biopelículas de PA como causa principal del aumento de la morbilidad y la mortalidad en FQ (60).

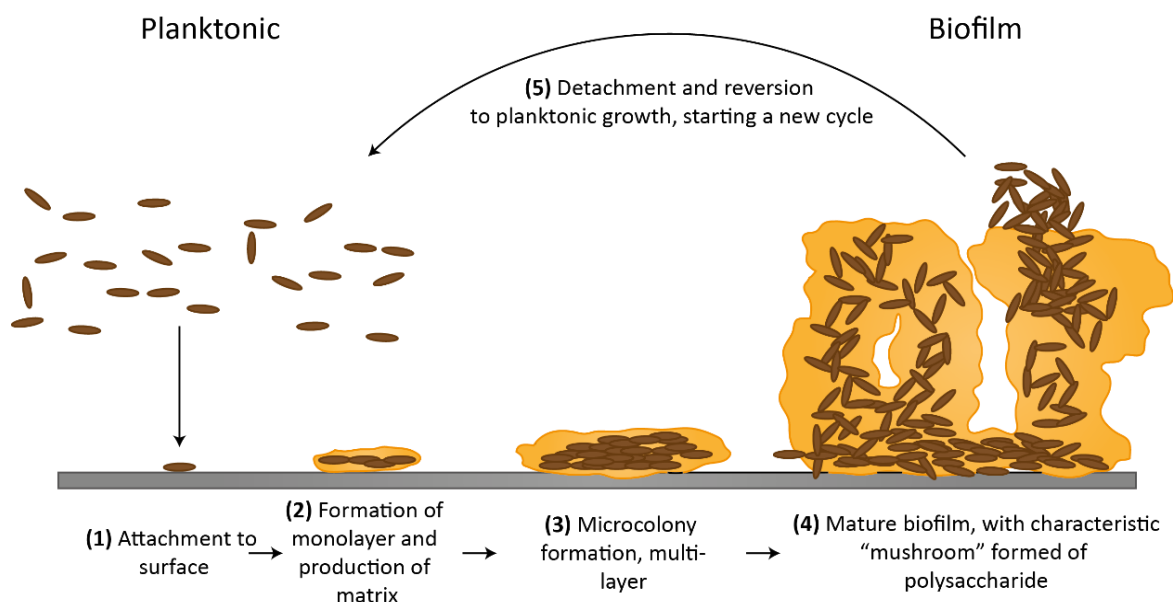


Figura 4. Representación esquemática de la formación de una biopelícula. Dicha formación comienza con una adhesión reversible de las células planctónicas (óvalos marrones) seguida de la unión a la superficie (gris) (1). Las bacterias luego forman una monocapa y se adhieren irreversiblemente produciendo una matriz extracelular (2). A continuación, se forma una microcolonia donde aparecen multicapas (3). Durante las etapas posteriores, la biopelícula madura y forma estructuras características en forma de "hongo" debido a los polisacáridos (4). Finalmente, algunas células comienzan a desprenderse y la biopelícula (que se muestra en amarillo) se dispersará (5). *Imagen adaptada de Vasudevan, 2014, J Microbiol Exp 1(3): 00014. DOI: 10.15406/jmen.2014.01.00014.*

1.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y SÍNTOMAS

La tos (98%) y la producción diaria de esputo (78%) son las manifestaciones clásicas de las bronquiectasias, que duran meses o años. Los volúmenes de expectoración son muy variables y el esputo suele ser inodoro, mucopurulento y tenaz. Los síntomas menos específicos incluyen rinosinusitis (73%) con o sin disminución del sentido del olfato, disnea (62%), dolor torácico pleurítico, sibilancias, fiebre (generalmente secundaria a una

infección), debilidad y pérdida de peso. La disnea ocurre típicamente en pacientes con bronquiectasias extensas, o secundariamente a una enfermedad concomitante (bronquitis crónica, enfisema). El dolor torácico pleurítico puede ocurrir en el 20% de los casos, y es más comúnmente secundario a tos crónica, pero también puede ocurrir en el contexto de agudización aguda. La pérdida de peso aparece en casos graves, debido al aumento de los requisitos calóricos asociados al aumento del trabajo de tos. Además, los pacientes pueden presentar episodios frecuentes de bronquitis, requiriendo terapia antibiótica repetida. Finalmente, se ha descrito incontinencia urinaria en mujeres con bronquiectasias (47%), pero la etiología no está clara (61). Una presentación menos común de las bronquiectasias incluye la hemoptisis episódica (27%) con poca o ninguna producción de esputo, también conocida como “bronquiectasia seca”, que generalmente resulta de daño de las vías respiratorias o infección aguda.

En cuanto al examen físico, los hallazgos no son específicos. Los hallazgos generales incluyen cianosis y plétora, debido a hipoxia crónica. La emaciación y la pérdida de peso sugieren una enfermedad avanzada, por lo que no son diagnósticos de bronquiectasia. También pueden presentarse pólipos nasales y signos de sinusitis crónica. Los crepitantes (73%), sibilancias (30%) y roncus se escuchan con mayor frecuencia en la auscultación pulmonar, consecuencia de la obstrucción del flujo de aire por secreciones y colapso de las vías respiratorias secundaria a la destrucción del árbol bronquial (61,62).

1.7 OUTCOMES CLÍNICOS

1.7.1 Morbi-mortalidad y complicaciones

Por una parte, las bronquiectasias se asocian con un marcado aumento de la mortalidad: un estudio reciente observó que la mortalidad ajustada por edad era el doble que la de la población general. Sin embargo, la tasa puede variar según las condiciones subyacentes

o predisponentes y las hospitalizaciones (62). Por otro lado, aquellos pacientes presentan una función pulmonar dañada: el descenso del FEV1 se acelera en comparación con los individuos sanos, con un descenso medio anual de 50 a 55 ml por año (63).

Otras complicaciones asociadas con la enfermedad son el aumento de los eventos cardiovasculares, la hipertensión pulmonar con disfunción sistólica del ventrículo derecho y el desarrollo de cánceres.

1.7.2 Sistemas de puntuación

El pronóstico puede ser evaluado con sistemas de puntuación, dirigidos a identificar agudizaciones frecuentes; de hecho, éstas se asocian a un aumento de hospitalizaciones, peor calidad de vida, síntomas diarios, deterioro de la función pulmonar y mortalidad: los pacientes con tres o más agudizaciones por año tienen el doble de tasa de mortalidad de quienes no experimentan agudizaciones. Además, dichas agudizaciones que requieren ingreso hospitalario son más del doble del riesgo de mortalidad posterior.

El EMBARC describió recientemente un sistema de puntuación para evaluar la severidad de la enfermedad, el Índice de gravedad de las bronquiectasias (BSI). Dicha puntuación se basa en una combinación de características clínicas, radiológicas y microbiológicas: los predictores de hospitalizaciones incluyen hospitalización previa, índice de disnea alto, FEV1 bajo, menor que 3 lóbulos involucrados en la TCAR y presencia de *Pseudomonas* en el esputo. La edad avanzada, el FEV1 bajo, la hospitalización previa y tres o más agudizaciones en el año se correlacionan con la mortalidad (64). Otro sistema de puntuación de gravedad es la puntuación FACED (FEV1, edad, colonización con *Pseudomonas*, afectación ampliada en la TC de tórax y disnea).

Tanto BSI como FACED son herramientas de gravedad validadas para pacientes con

bronquiectasia. Sin embargo, un estudio reciente mostró que el BSI predijo con mayor precisión las agudizaciones, las hospitalizaciones, los síntomas respiratorios y la calidad de vida que la puntuación FACED (65).

1.7.3 Otros predictores de pronóstico

Además, otras entidades tienen implicación en el pronóstico. Como se vio anteriormente, la presencia de elastasa de neutrófilos, proteínas específicas y bacterias en el esputo tienen una correlación directa con la gravedad de la enfermedad y podrían actuar como biomarcadores en este contexto. Sobre la relación entre la infección crónica por PA y el pronóstico, una revisión sistemática de estudios observacionales identificó su asociación con un aumento de tres veces en el riesgo de mortalidad, un aumento de siete veces en el riesgo de ingreso hospitalario y un promedio de una agudización adicional por paciente por año (66). El estado clínico asociado a la coexistencia de bronquiectasias y EPOC se asocia a una mayor gravedad y en consecuencia a un peor pronóstico (67). Los pacientes con deficiencia de vitamina D pueden tener más probabilidades de desarrollar agudizaciones más frecuentes, peores síntomas respiratorios y aumento de los marcadores de inflamación de los neutrófilos en el esputo. El mecanismo de asociación no está claro (68).

1.7.4 Calidad de vida

La calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) se deteriora significativamente en las bronquiectasias, principalmente debido a la inflamación crónica y el aumento de la morbimortalidad. Se pueden utilizar diferentes cuestionarios para evaluar los síntomas, el

funcionamiento y el estado de salud desde la perspectiva del paciente. Sus principales objetivos son orientar la terapia, evaluar la efectividad del tratamiento y mejorar la comunicación entre el paciente y el médico.

El cuestionario respiratorio de St. George (SGRQ), aunque originalmente fue diseñado para pacientes con EPOC, ha sido validado para evaluar el deterioro de la calidad de vida en pacientes con bronquiectasias. Esta medida autoadministrada se divide en tres componentes: 1) Síntomas (tos, producción de esputo, sibilancias, disnea: duración y frecuencia), 2) Actividad (limitada por la disnea) y 3) Impactos (empleo, control de la salud, pánico, estigmatización, necesidad de medicación y sus efectos secundarios, expectativas de salud, alteración de la vida diaria). También se utiliza en poblaciones asmáticas y con EPOC (69).

Otro cuestionario validado es el de Calidad de Vida-Bronquiectasias (QOL-B): este contiene 8 ítems (capacidad física, limitaciones de rol, vitalidad, estado emocional, función social, percepción de la salud, carga de tratamiento y síntomas respiratorios) para evaluar la calidad de vida de los pacientes con bronquiectasias (70,71).

El cuestionario de tos de Leicester (LCQ) es validado específico de síntomas diseñado para evaluar el impacto de la gravedad de la tos, un síntoma importante de las bronquiectasias (72).

Sin embargo, debido a la longitud de estos cuestionarios, en la práctica clínica se prefieren herramientas más breves, como el Cuestionario de salud de bronquiectasias (BHQ) o la Prueba de evaluación de la EPOC (CAT) que evalúa la insuficiencia respiratoria (73).

1.7.5 Carga económica

Los pacientes con bronquiectasias utilizan amplios recursos sanitarios debido a la

gravedad de la enfermedad, las frecuentes visitas ambulatorias y hospitalizaciones y el uso de antibióticos. Es necesaria una mejor comprensión de la carga económica de la enfermedad para lograr mejores resultados clínicos y económicos, debido a la creciente prevalencia de bronquiectasias (71).

1.8 EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA

El diagnóstico debe sospecharse en pacientes con producción persistente o recurrente de esputo mucopurulento o purulento, particularmente con factores de riesgo asociados relevantes (73). El propósito de la evaluación es confirmar el diagnóstico a través de imágenes radiográficas, identificar causas potencialmente tratables y patógenos microbiológicos con pruebas de laboratorio y realizar una evaluación funcional mediante pruebas de función pulmonar.

1.8.1 Pruebas de laboratorio

La elección de las pruebas de laboratorio debe individualizarse según el paciente y la situación clínica. Puede incluir: un hemograma completo, donde los principales hallazgos incluyen anemia, policitemia (secundaria a hipoxia crónica), aumento del porcentaje de neutrófilos, elevación de eosinófilos (criterio ABPA); Cuantificación de IgG, IgM e IgA para excluir hipogammaglobulinemia; pruebas de fibrosis quística (prueba del sudor, gen CFTR); y pruebas adicionales según la sospecha clínica (niveles cuantitativos de alfa1-antitripsina en suero, niveles de IgE en suero para ABPA, pruebas autoinmunes).

Se puede utilizar un análisis de esputo para fortalecer aún más la sospecha clínica. De hecho, los microorganismos seleccionados pueden detectarse mediante tinción de Gram, cultivo o análisis de ADN. Su detección es útil ya que pueden desempeñar un papel en

las características clínicas, el tratamiento y el resultado de los pacientes. Por ejemplo, PA está relacionada con un peor resultado, o la presencia de especies mucoides de *Pseudomonas* y *Escherichia coli*, podría sugerir fibrosis quística. Los patógenos más comunes que se encuentran en las bronquiectasias son *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* y menos frecuentemente con *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterobacteriaceae* (17).

Además, varios estudios han intentado identificar biomarcadores útiles para el manejo de pacientes con bronquiectasias, algunos de los cuales han mostrado resultados prometedores. Los candidatos a biomarcadores emergentes en el esputo incluyen elastasa de neutrófilos, metaloproteinasas de matriz, proteínas mucosas, carga bacteriana en las vías respiratorias, péptidos antimicrobianos y proteína de la zona del embarazo (una proteína de neutrófilos intracelular). Se ha demostrado que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, la función pulmonar, la extensión radiológica e incluso con la presencia de PA en las vías respiratorias. La presencia de fibrinógeno o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el plasma también podría representar biomarcadores sistémicos potenciales, que se correlacionan con la gravedad de las bronquiectasias (74–76).

Evaluación microbiológica del esputo

Las muestras de esputo se recogen en viales estériles y se procesan en el laboratorio antes de las dos primeras horas a su obtención. Se realiza una tinción de Gram en el área de máxima purulencia del esputo y se examina en busca de leucocitos y células epiteliales. Solo las muestras de esputo con una clasificación de Murray-Washington de IV o superior se procesan para cultivo (grado IV, 10-25 células epiteliales y >25 leucocitos por campo; grado V, (\leq 10 células epiteliales y >25 leucocitos por campo) Grado VI (\leq 10 células

epiteliales y >10 leucocitos por campo) usando un microscopio de alta magnificación (100X) (77). Los esputos que no cumplan con estos criterios no se considerarán representativos de las vías bajas y por tanto se serán candidatos para cultivo.

Todas las muestras microbiológicas se plaquean en agar sangre, chocolate, se tiñen mediante el método Ziehl-Neelsen y se incuban en Lowenstein y Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) y el cultivo líquido automatizado BD BACTEC™. Los cultivos se evalúan después de 48h de incubación y de 6 semanas en el caso de los cultivos de Lowenstein para la determinación de *Mycobacterium* spp. Se realizan test de susceptibilidad antibiótica a las cepas aisladas mediante las técnicas de disco difusión y E-test cuando sea necesario. Las cepas se clasifican como sensibles, intermedias y resistentes según los criterios publicados por el EUCAST (78).

Los microorganismos aislados se identificarán mediante MALDI-TOF(79). Se clasificarán como potencialmente patogénicos (PPMs), lo que incluye *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, bacilos Gram negativos, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* y microorganismos potencialmente no patogénicos (no-PPMs), lo que incluye microorganismos de la flora habitual como: *Streptococcus viridans*, *Neisseria* spp, *Candida* spp, *Corynebacterium* spp, *H. parainfluenzae* y *Staphylococcus epidermidis*.

1.8.2 Diagnóstico por imágenes

Se deben obtener radiografías de tórax posterior-anterior y lateral en todos los pacientes, donde en la mayoría de los casos se encontrarán anomalías radiológicas. Incluyen atelectasias lineales, vías respiratorias dilatadas y engrosadas (tranvía o líneas paralelas,

sombras anulares en la sección transversal), opacidades periféricas irregulares (sugestivas de tapones mucopurulentos) y panal de abejas. Los hallazgos en la radiografía de tórax son sospechosos, pero no diagnósticos.

La tomografía computarizada (TC), particularmente la TC de alta resolución (TCAR) es la modalidad de imagen preferida de la bronquiectasia y presenta una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico. Se considera la prueba estándar para el diagnóstico. La dilatación bronquial característica puede verse como:

- Un diámetro de la luz de las vías respiratorias entre 1 y 1,5 veces el vaso adyacente;
- Falta de ahusamiento bronquial de más de 2 cm de longitud, distal de una bifurcación de la vía aérea (apariencia de vía de tranvía);
- Visibilidad de las vías respiratorias dentro de 1 cm de la superficie pleural costal o en contacto con la pleura mediastínica.

Otros signos indirectos de dilatación bronquial incluyen engrosamiento de la pared bronquial, impactación de moco, opacidades de árbol en yema y atrapamiento de aire en la TC espiratoria.

Las bronquiectasias se pueden clasificar según su apariencia morfológica. La primera y más frecuente forma es la bronquiectasia cilíndrica, caracterizada por bronquios dilatados que, según el corte bronquial, pueden verse como vías de tranvía paralelas o presentar un aspecto de anillo de sello. La segunda es la forma varicosa: los bronquios presentan contornos irregulares con áreas alternas de luz dilatada y contraída. La tercera y más grave categoría es la morfología quística, caracterizada por dilatación sacular de los bronquios y apariencia de panal. Además, la tomografía computarizada puede ser útil para identificar la etiología subyacente: por ejemplo, una distribución central sugiere ABPA,

mientras que la fibrosis quística afecta principalmente a los lóbulos superiores (10,17,40,45).

En la figura 5 se muestra una imagen radiológica por TC de los pulmones donde se muestran 3 tipos de patrones radiológicos de las BQ. En las BQ cilíndricas el bronquio dilatado es de calibre uniforme con una falta de estrechamiento de las vías aéreas distales (Figura 5).

La figura 5A y 5B muestra una BQ varicosa en la que los bronquios no son uniformes y aparecen irregulares y distorsionados. En BQ císticas hay una dilatación sacular del bronquio con múltiples bronquios saculares que dan apariencia de clústeres císticos (Figura 5C). La cavitación (Figura 5D) también se puede ver en BQ y representa secuelas de una previa tuberculosis pulmonar, (NTM), enfermedad pulmonar o infección fúngica (p.ej. aspergilosis pulmonar crónica, Figura 5E). Un hallazgo muy común es el patrón de “tree-in-bund” debido a complementos de mucosidades de las vías aéreas distales pequeñas o bronquiolitis infectivas. (Figura 5F)

La distribución de las BQ puede también ofrecer pistas sobre la potencial etiología. Por ejemplo, las BQ central es observada en ABPA (Figura 5G), traqueobroncomegalia (Mounier-kuhn syndrome); en lóbulos altos y medios predominantes en BQ se observa en fibrosis quística, TB previa, y ABPA (Figura 5H); las BQ lobares localizadas (Figura 5G) pueden ser debidas a la obstrucción bronquial con neumonía lobar previa. La figura 5J muestra BQ media lobar a veces observada en el síndrome de Lady Windermere. Las BQ de lóbulos bajos se pueden observar en disquinesia cística primaria, inmunodeficiencia y deficiencia de alfa-1-antitripsina. El hallazgo de dextrocardia o “*situs inversus*” sugieren Disquinesia ciliar primaria como causa. (Figura 5K). Finalmente, el hallazgo de la impactación mucosa es un indicador como potenciador del

aclaramiento aéreo y posiblemente la necesidad de aplicar mucolíticos (Figura 5L).

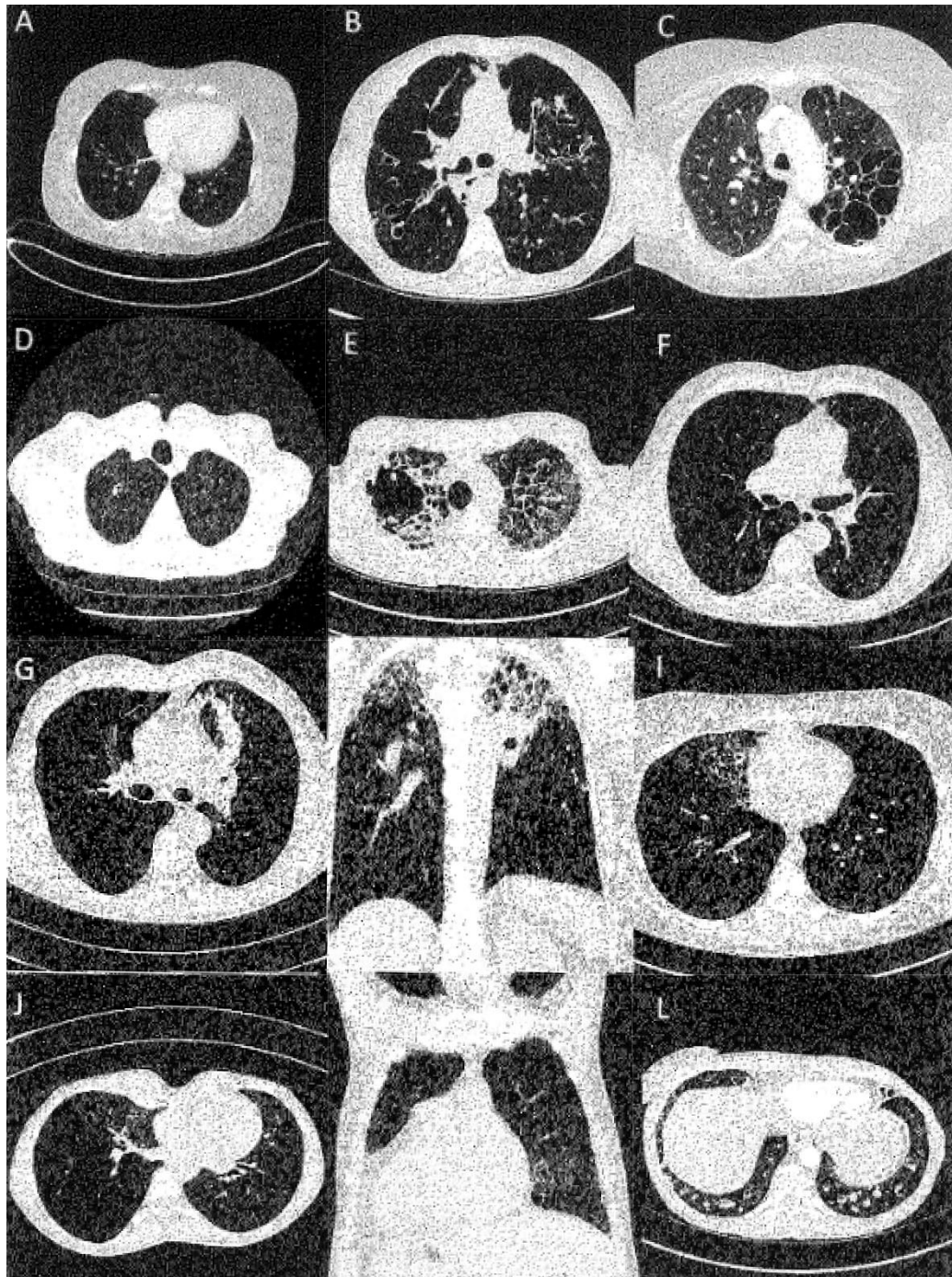


Figura 5. Imagen radiológica por TC de los pulmones donde se muestran 3 tipos de patrones radiológicos de las BQ. Los detalles de cada imagen se describen en el texto. *Imagen adaptada del capítulo de José Loebinger. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. Vol:42, No.4/2021*

1.8.3 Tipos de Bronquiectasias

1.8.3.1 Bronquiectasias difusas

Las bronquiectasias difusas se desarrollan con mayor frecuencia en pacientes con defectos genéticos, inmunológicos o anatómicos que afectan las vías aéreas. En los países desarrollados, la causa de muchos casos inicialmente aparenta ser idiopática, probablemente en parte debido a que la aparición es tan lenta que el problema desencadenante no se evidencia con facilidad para el momento en que se reconoce la bronquiectasia. Con las nuevas pruebas mejoradas, genéticas e inmunológicas, un número creciente de informes describe el hallazgo de una etiología en estos casos idiopáticos después de una evaluación cuidadosa y sistemática.

La fibrosis quística se suele asociar con este trastorno y la fibrosis quística no diagnosticada previamente puede representar hasta el 20% de los casos idiopáticos. Incluso los pacientes heterocigotos, que normalmente no tienen manifestaciones clínicas de la FQ, pueden tener un mayor riesgo de bronquiectasias.

Las deficiencias inmunológicas como la inmunodeficiencia común variable (IDCV) también llevan a la enfermedad difusa, al igual que las anormalidades raras en la estructura de las vías aéreas. La desnutrición y la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) también parecen aumentar el riesgo.

Los defectos congénitos en el mecanismo de limpieza mucociliar, tales como los síndromes de discinesia ciliar primaria también pueden ser una causa, lo que explica el casi 3% de los casos previamente idiopáticos.

Las bronquiectasias difusas a veces complican afecciones autoinmunitarias más comunes,

como la artritis reumatoide o el síndrome de Sjögren, y pueden ocurrir en presencia de una neoplasia maligna hematológica, un trasplante de órgano o debido al inmunocompromiso asociado con el tratamiento de estos trastornos. Las bronquiectasias también pueden estar relacionadas con afecciones más comunes, que incluyen enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, o aspiración crónica y recurrente.

La aspergilosis broncopulmonar alérgica, es una reacción de hipersensibilidad contra especies de *Aspergillus* que se produce sobre todo en personas con asma, pero a veces en pacientes con fibrosis quística y puede causar las bronquiectasias o contribuir con ellas.

En los países en desarrollo, la mayoría de los casos son probablemente causados por la tuberculosis, especialmente en pacientes con la función inmune alterada debido a desnutrición e infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV).

1.8.3.2 Bronquiectasias focal

Las bronquiectasias focales se desarrollan como resultado de neumonías sin tratar o de una obstrucción (p. ej., debido a cuerpos extraños, tumores, modificaciones posquirúrgicas, adenopatías). Las micobacterias (tuberculosas o no tuberculosas) pueden causar bronquiectasias focales y colonizar los pulmones de los pacientes con bronquiectasias debidas a otros trastornos.

1.8.4 Pruebas de función pulmonar

Las pruebas de función pulmonar permiten evaluar el deterioro causado por las bronquiectasias. Más del 50% de los pacientes tienen un patrón de obstrucción del flujo de aire en la espirometría (FVC reducida o normal, volumen espiratorio forzado bajo en un segundo -FEV1 y FEV1 / FVC bajo), generalmente no reversible con terapia

broncodilatadora. Además, en comparación con los individuos sanos, los pacientes con bronquiectasias presentan un mayor descenso anual del FEV1. Sin embargo, también se puede observar patrón ventilatorio restrictivo, mixto y función pulmonar preservada, normalmente relacionada con enfermedad avanzada severa secundaria a cicatrización y atelectasia (17,65). Pueden ser necesarios otros estudios según la etiología sospechada.

1.8.5 Diagnóstico diferencial

Es necesario descartar la presencia de enfermedades de confusión, como EPOC, malignidad o enfermedad pulmonar intersticial. El último puede simular bronquiectasias, ya que la fibrosis puede distorsionar el parénquima pulmonar al tirar o dilatar las vías respiratorias ("bronquiectasias por tracción"). La tomografía computarizada es útil en el diagnóstico diferencial.

1.9 TRATAMIENTO

Los principales objetivos del tratamiento de las bronquiectasias son prevenir las agudizaciones, reducir los síntomas, detener la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida. El primer paso es detectar cualquier condición causal asociada o conocida asociada con bronquiectasias, como infección por NTM, inmunodeficiencia primaria, aspiración recurrente, ABPA, enfermedades inmunes o defectos anatómicos. La importancia de diagnosticar esas entidades radica en el hecho de que cada una posee un tratamiento eficaz. Sin embargo, la mayoría de las enfermedades subyacentes no pueden tratarse ya que son el resultado de una infección o lesión previa, o de alteraciones congénitas (FQ, síndrome de Young, discinesia ciliar primaria y deficiencia de alfa1-antitripsina). En esos casos, los pacientes y la familia se beneficiarán del asesoramiento genético.

1.9.1 Medidas generales

En el tratamiento de las bronquiectasias, se deben considerar medidas generales, como dejar de fumar (irritante pulmonar) o una ingesta nutricional adecuada. La eliminación de las secreciones de las vías respiratorias ayuda a reducir los síntomas de la tos y evitar los tapones de moco: fisioterapia regular, agentes mucolíticos, solución salina hipertónica nebulizada o manitol inhalado son útiles para este propósito. El control del riesgo de infección es otro punto importante en el manejo general de las bronquiectasias, principalmente mediante la vacunación contra *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*.

1.9.2 Terapia con antibióticos

Los antibióticos están indicados como terapia preventiva para pacientes que tienen agudizaciones recurrentes, definidas por la presencia de dos o tres agudizaciones en un año. De acuerdo con las pautas de la European Respiratory Society (ERS), esos pacientes se beneficiarán de una terapia con antibióticos macrólidos a largo plazo (azitromicina). Los macrólidos son eficaces contra PA, que es uno de los microorganismos dominantes en los pacientes con bronquiectasias pulmonares, y se asocia con un mayor daño y deterioro de la respuesta inmunitaria del huésped (74,75). Muchos estudios demostraron que la azitromicina mejoró la frecuencia de las agudizaciones, la espirometría y la microbiología del esputo en las bronquiectasias (51). Sin embargo, antes de iniciar la monoterapia con azitromicina se deben realizar tinciones y cultivos de esputo para NTM, ya que el 60% de los pacientes son portadores y la terapia desencadenaría el desarrollo de resistencias.

Cuando la profilaxis antibiótica oral está contraindicada, no se tolera o es ineficaz, está indicado el tratamiento con tobramicina inhalada. Este tratamiento también se

recomienda para pacientes con tres o más agudizaciones por año, pacientes con morbilidad significativa y esputo que desarrolla un patógeno potencial Gram negativo (PA) (47).

Es poco probable que la erradicación de la infección crónica por PA tenga éxito, pero las directrices de la ERS sugirieron que podría ser útil en pacientes recién infectados. Por ahora, se necesita más investigación sobre dicho tema.

1.9.3 Tratamiento de las agudizaciones

Durante las agudizaciones de las bronquiectasias, la reducción de la carga bacteriana es fundamental para reducir la inflamación sistémica y de las vías respiratorias. La elección del régimen antibiótico debe guiarse por cultivos de esputo y sensibilidades previas, alergias, antecedentes de éxito y fracaso y la vía de administración. Las pautas de la ERS sugieren un ciclo de antibióticos de 14 días, con ciclos más cortos o largos según las condiciones clínicas específicas, como la gravedad de la exacerbación, la respuesta del paciente al tratamiento o la microbiología (47). Se prefieren los antibióticos orales en pacientes clínicamente estables, donde las opciones de primera línea son amoxicilina o macrólidos. En presencia de organismos productores de betalactamasa, se preferirán los siguientes antibióticos: amoxicilina-clavulánico, cefalosporina de 2ª a 3ª generación, doxiciclina o fluoroquinolona. Si el paciente presenta antecedentes de múltiples agudizaciones, o no posee datos recientes de cultivo de esputo, el antibiótico de elección será una fluoroquinolona (levofloxacina, moxifloxacina). En pacientes graves hospitalizados, se indicará la vía intravenosa con un antibiótico sensible a PA. Si se detecta en cultivos de esputo, *el Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) debe cubrirse con vancomicina o linezolid. Si la agudización provocada por el virus de

la influenza, el tratamiento habitual es oseltamivir oral o baloxavir, menos de 72 h después del inicio de los síntomas. Las agudizaciones causadas por NTM y *Aspergillus* también poseen un tratamiento eficaz.

1.9.4 Otras terapias médicas

Los broncodilatadores inhalados, incluidos los de acción corta y prolongada, pueden ser apropiados para las vías respiratorias. Puede haber hiperreactividad, pero no se han realizado ensayos en bronquiectasias. Están indicados cuando la espirometría muestra una mejoría de la limitación del flujo aéreo antes y después del broncodilatador.

Los medicamentos antiinflamatorios, como los glucocorticoides, los agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y las estatinas, también podrían ser beneficiosos. En primer lugar, los glucocorticoides inhalados no están indicados en pacientes con bronquiectasias excepto en presencia de asma o EPOC concomitantes. En cuanto a los glucocorticoides orales, deben reservarse, junto con el tratamiento antibacteriano, para las agudizaciones agudas con sibilancias que sugieren asma o EPOC.

1.9.5 Enfermedad avanzada

A pesar del tratamiento, algunos pacientes pueden ser refractarios al tratamiento médico. En esos casos, se pueden contemplar dos opciones. La primera es la resección quirúrgica, que incluye la extirpación de segmentos o lóbulos bronquiectásicos, con preservación de áreas sanas. El segundo es el trasplante de pulmón. Los criterios de selección de los pacientes deben estar bien definidos, ya que las comorbilidades juegan un papel crítico en las tasas de mortalidad perioperatoria.

1.9.6 Opciones de tratamiento recomendadas por las Guidelines

1.9.6.1 Terapia de erradicación e infección bronquial

La PA es un microorganismo clave que causa infección crónica en BQ debido a su capacidad para formar biopelículas y desarrollar resistencia a los antimicrobianos, manteniendo así la virulencia (80–83). Las directrices publicadas por la British Thoracic Society (BTS) y ERS recomiendan diferentes tratamientos para erradicar la PA (84,85). Básicamente, las guías ERS proponen tres estrategias de erradicación basadas en estudios publicados que carecían de controles. Por lo tanto, en la actualidad, se desconoce el mejor régimen para lograr la erradicación. Vallières *et al.* realizaron un estudio observacional entre enero de 2007 y diciembre de 2014 entre 64 pacientes adultos con BQ en el que hubiera habido al menos un intento de erradicación (85). Colistimetato de sodio nebulizado con ciprofloxacina, prescrita durante al menos 3 semanas ($n = 27$, 42%), fue el régimen más utilizado. La tasa de éxito de la erradicación a los 6 meses fue del 52% ($n = 33$), y el 70% ($n = 23$) de estos los pacientes permanecieron libres de PA durante al menos 1 año. La combinación de anti-sistémicos (oral o intravenoso) e antibióticos inhalados fueron superiores en comparación con los antibióticos sistémicos solo en la erradicación inicial de PA. Otro hallazgo notable fue que la terapia crónica con azitromicina fue más frecuente entre los pacientes en los que la infección por PA fue exitosa (75 vs.47%, $p = 0,04$) (85).

Orriols *et al.* realizaron un estudio aleatorizado en 35 pacientes después del primer aislamiento de PA(86). Los participantes recibieron por vía intravenosa ceftazidima y tobramicina durante 14 días seguidos de 3 meses de tobramicina nebulizada o placebo, antes siendo objeto de seguimiento durante 12 meses. Encontraron que la mediana del tiempo hasta la recurrencia de la PA fue mayor en el grupo de tobramicina y hubo una

reducción de las agudizaciones, hospitalización, ingresos y días de hospitalización en comparación con grupo placebo. Sin embargo, el pequeño tamaño de la muestra y las limitaciones en el diseño del estudio sugieren que es necesario que los resultados se interpreten con precaución (86). Se necesitan más estudios de alta calidad en cohortes más grandes para mejorar los resultados de estudios previos si queremos erradicar la PA temprano y evitar el desarrollo de enfermedades crónicas e infección bronquial.

1.9.6.2 Tratamiento en agudizaciones

Las agudizaciones pulmonares en pacientes con BQ se asocian con aumento de las vías respiratorias locales y respuesta de la inflamación sistémica y con enfermedad progresiva que genera un negativo impacto en los síntomas diarios, la calidad de vida, la función pulmonar, y mortalidad (85–88). Se propuso un consenso internacional en que las agudizaciones de BQ se pueden definir como (1) un deterioro en tres o más síntomas clave (es decir, tos, volumen de esputo y / o consistencia, purulencia del esputo, dificultad para respirar y / o tolerancia al ejercicio, fatiga y / o malestar, y hemoptisis) durante al menos 48 horas y (2) una determinación por un médico que hace un cambio en el tratamiento de BQ(89–91).

Los cultivos de esputo regulares cuando los pacientes están estables puede ayudar a la hora de decidir qué antibiótico es más útil durante una exacerbación. El tratamiento antibiótico empírico se divide en sí debe ser dirigido contra PA u otro microorganismo (10,11,62). El Ciprofloxacino oral se puede utilizar durante 2 a 3 semanas en casos de agudizaciones leves, pero en los casos moderados / graves se requiere la terapia de combinación con una vía intravenosa con un antibiótico antipseudomonas para agudizaciones de la PA 74. No hay una duración establecida para la terapia, pero parece que los resultados son buenos después de 14 días de tratamiento antibiótico (51,58)

Se necesitan mas estudios multicéntricos sobre el tratamiento de las agudizaciones de la PA para que podamos llegar a un consenso sobre el manejo optimo. Actualmente existen las guias de la Sociedad Europea Respiratoria (“ERS”) y las guias de la Sociedad Britanica Torácica (“BTS”) que recomiendan tratamientos para la erradicación, la infección cronica bornquial y las agudizaciones. A continuación la tabla 1 muestra las recomendaciones propuestas por las sociedades ERS y BTS.

Tabla 1. Opciones de tratamiento recomendadas por las Guidelines de ERS y BTS. Tabla adaptada de: *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine Vol. 42 No. 4/2021 © 2021. Thieme. All rights reserved.*

	Treatment	Duration	Comments
Eradication	→ Ciprofloxacin 750 mg/12 h orally + Two IV antibiotics with antipseudomonic activity + Inhaled antibiotic anti- <i>Pseudomonas</i> activity	→ For 2 wk → From the beginning of the oral treatment until 3 mo	These eradication treatment alternatives may vary (first IV treatment followed by inhaled antibiotic) according to clinical experience, since no protocol has been shown to be superior to another. The guidelines recommended repeat sputum after each step and continue to the next step if the culture remains positive
Chronic bronchial infection	→ Inhaled antipseudomonic antibiotic → Macrolides	Probably years, depend on benefits/risk	No protocol has been shown to be superior to another. Patients with insufficient response treated with cycles on-off, inhaled antibiotics can be use continuously or rotating them without rest periods. Macrolides are suggested in whom an inhaled antibiotic is contraindicated, not tolerated, or not feasible or in addition to or in place of an inhaled antibiotic
Exacerbation	Antipseudomonic antibiotic treatment according to antibiogram	2-3 wk	If the exacerbation is moderate or severe, antibiotic should be used IV

Abbreviation: IV, intravenous.

Note: The proposed table is based on the recommendations of the European Respiratory Society ERS, SEPAR, and the British Thoracic Society (BTS) clinical guidelines.

2.1. ANÁLISIS GENÓMICO DEL 16S rRNA

2.1.1 TECNOLOGÍAS Next Generation Sequencing (NGS)

Las tecnologías para secuenciar el ADN han mejorado considerablemente estos últimos años, particularmente desde la aparición de la “Next Generation Sequencing” (NGS), que ha revolucionado la investigación genómica. De hecho, esta tecnología de secuenciación masiva de ADN en paralelo ha permitido un gran aumento en la velocidad y una disminución en el costo de la secuenciación del genoma. La NGS se puede utilizar para secuenciar el genoma completo de un individuo o porciones más pequeñas del genoma, como el exoma o un subconjunto preseleccionado de genes, a partir de una variedad de fuentes de ADN. Se han desarrollado varias "plataformas" para NGS algunas de ellas representadas en la figura 6.



Figura 6. Plataformas de NGS más representativas y usadas en estudios de microbioma. Imagen adaptada de <https://en.genomics.com.tw/ngs/detail/100>.

En todas ellas, la preparación de la muestra suele ser común: el ADN del paciente, que sirve como molde, se purifica, fragmenta y amplifica mediante PCR. A este paso le sigue el aislamiento físico de los fragmentos de ADN mediante la unión a superficies sólidas o pequeñas perlas: estos pequeños fragmentos serán los que generen los datos de la secuencia(92) Finalmente, los datos obtenidos se ensamblan en una secuencia genómica continua utilizando algoritmos informáticos y se alinean computacionalmente con un genoma o secuencia de referencia. En la práctica clínica, la secuenciación de Sanger se utiliza para confirmar la presencia de mutaciones específicas identificadas, debido a la mayor estandarización de los métodos de secuenciación tradicionales. Solo se informan las variantes que han sido validadas por esta técnica. Numerosos estudios están examinando la utilidad clínica de NGS: por ahora, esta técnica está reservada para escenarios clínicos en los que se considera útil para determinar las secuencias de múltiples genes.(93)

La aplicación más común son los paneles de genes dirigidos a NGS diseñados en torno a una indicación clínica específica, que son útiles en la genómica del cáncer (como el cribado o la evaluación de la respuesta al tratamiento), en la genética clínica (cribado y diagnóstico de trastornos genéticos) o en el análisis de genoma (organización, expresión génica, variantes y polimorfismos). De hecho, NGS captura un espectro más amplio de mutaciones que las técnicas preexistentes por métodos Sanger (94).

El procedimiento general de las técnicas de secuenciación masiva representado en la Figura 7, incluye en términos generales:

1. Fragmentación del ADN: se generan pequeños fragmentos (aleatorios en caso de técnicas WGS o establecidos en técnicas de “target” amplicon) de distinto tamaño y posteriormente se unen a sus extremos unas moléculas llamadas

adaptadores. El conjunto de todos los fragmentos de ADN unidos a sus adaptadores se conoce como librería.

2. Enriquecimiento (opcional): consiste en seleccionar exclusivamente las áreas de interés antes de la secuenciación.

2.1. Métodos de captura por hibridación en fase sólida: se construyen microarrays con oligonucleótidos unidos covalentemente a una superficie sólida con secuencias complementarias a aquellas que se quieren seleccionar. Las áreas de interés del ADN fragmentado hibridan con estos oligonucleótidos y permanecen unidas a la superficie sólida. Roche/NimbleGen ha desarrollado y comercializa estos microarrays como el desarrollado para la captura del exoma (SeqCap EZ Exome capture)

2.2. Métodos de amplificación mediante PCR: la amplificación se produce mediante el anclaje del fragmento de ADN, a través de sus adaptadores, a una superficie sólida. Las plataformas que requieren la amplificación clonal de los fragmentos de ADN se denominan de segunda generación. Existen plataformas, denominadas de tercera generación, que no requieren la amplificación de los fragmentos de ADN, reduciendo el tiempo de trabajo y abaratando el proceso de secuenciación.

3. Ligación del material amplificado a una superficie sólida donde se llevará a cabo la reacción de secuenciación.

4. Secuenciación del material genético: la secuenciación y detección de las bases ocurren al mismo tiempo en todas las moléculas de ADN (secuenciación masiva y paralela)

5. Creación de archivos con información de la secuenciación y alineamiento de las lecturas contra un genoma de referencia: los cientos de miles de lecturas obtenidas son almacenadas en archivos fastq: 1) dos lecturas por paciente en el caso de obtener las dos cadenas de ADN conocido como “paired-end” o 2) una lectura por paciente en el caso de secuenciar solo una cadena de ADN conocido como “single-end”. Se requiere el empleo de potentes herramientas informáticas para proceder al alineamiento de las secuencias, y posteriormente generar una base de datos con las variantes obtenidas.

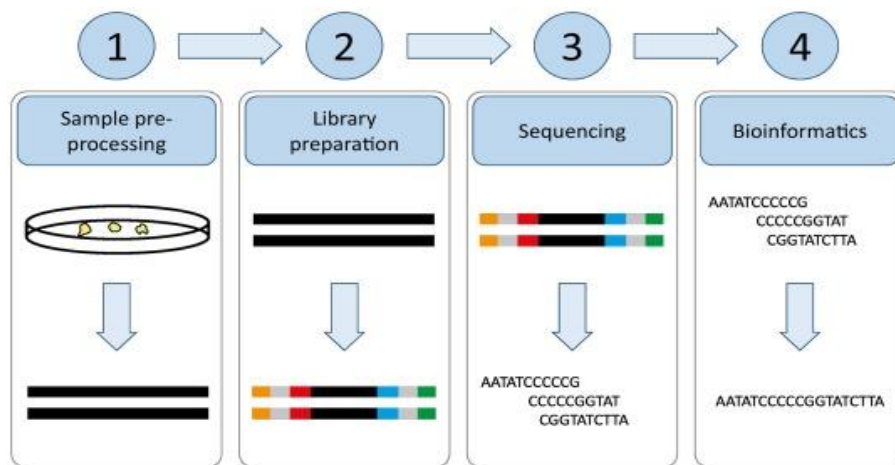


Figura 7. Diagrama del proceso general de obtención de secuencias mediante NGS.. *Imagen adaptada de J.F. Hess et al. Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. Biotechnology Advances Volume 41, July–August 2020, 107537.*

Hoy en día, NGS se está demostrando su utilidad en el campo de la microbiología. La secuenciación del gen *16S rRNA* es el método más común que se dirige a los genes para estudiar la taxonomía y la filogenia bacteriana (95). La definición genómica de patógenos podría sustituir su caracterización convencional por morfología, propiedades de tinción y criterios metabólicos, mejorando el diagnóstico de infección y por tanto la evolución del paciente. Sin embargo no permiten distinguir entre colonización e infección y no es rápido debido a la gestión de datos que requiere de análisis bioinformáticos complejos. Además, NGS puede albergar información adicional sobre la sensibilidad y la resistencia a los

fármacos, la relación con otros patógenos, pero también sobre su papel en un organismo sano y en la fisiopatología de la enfermedad(96)

De hecho, cada individuo tiene un perfil de microbiota único, definido como el conjunto de microorganismos presentes en un ambiente definido, que han coevolucionado con el huésped y coloniza sus tejidos mucosos, formando una relación mutualista y simbiótica. El término microbioma se utiliza para describir todo el hábitat, que incluye los microorganismos, sus genomas y las condiciones ambientales circundantes. Los principales tejidos colonizados incluyen la cavidad oral, el tracto gastrointestinal, la piel, el tracto vaginal y el tracto respiratorio.

2.1.2 Análisis bioinformático

Una vez obtenidos los datos de la secuenciación se realizan los análisis bioinformáticos, para procesar e interpretar las secuencias, en la figura 7 se representa el diagrama de flujo de trabajo asociado a los análisis bioinformáticos realizados en esta tesis . Un “operational taxonomic units” (OTU), es decir las unidades taxonómicas identificadas, corresponden a la secuencia consenso obtenida a partir de las secuencias con un 97% de homología. Las OTUs tienen el gran sesgo de agrupar en un mismo OTU secuencias muy similares si se trabaja en el 97% de homología, es por ello que se ha intentado mejorar la asignación de OTU utilizando agrupaciones con un 99% de similitud entre secuencias (97) Como alternativa a las OTUs apareció el enfoque que utiliza ASV (Amplicon Sequence Variants), que son un recuento del número de veces que se repite una secuencia exacta con 100% de homología (98) Este método presenta una resolución mucho mayor, permitiendo una identificación más precisa pero al ser tan restrictivo y buscar el 100% de homología nos puede llevar a la pérdida de información cuando lo que se busca es una

clasificación taxonómica debido a que pequeñas variantes que pertenecen al mismo taxón pueden ser eliminadas por buscar el 100% de homología (98,99)

Cabe tener en cuenta para este tipo de análisis la posible formación de las quimeras (elongación incompleta de los amplicones). Estas ocurren por errores durante la PCR, una amplificación de secuencias muy similares a la deseada, un alto número de ciclos de PCR o tiempos de elongación cortos, lo que provoca esta mencionada elongación incompleta de los amplicones, que se usarán como molde en la siguiente amplificación (100,101). Para la erradicación de las quimeras, existen diferentes algoritmos que se basan en la comparación con bases de datos de referencia (102,103). Finalmente, mediante la asignación taxonómica, se identifican los diferentes microorganismos presentes en la muestra. Para realizar esta identificación se usan bases de datos de referencia del gen completo *16S rRNA*, creadas a partir de microorganismos de cultivo o estudios metagenómicos previos. Las principales bases de datos que se utilizan son: SILVA ribosomal RNA database (SILVA), Green Genes (GG), y Ribosomal Database Project (RDP) (104–106). Con estas bases de datos se comparan, por alineamiento, las secuencias obtenidas experimentalmente con las secuencias de referencia, para obtener la identificación taxonómica, este análisis puede realizarse con paquetes del software QIIME2 (107).

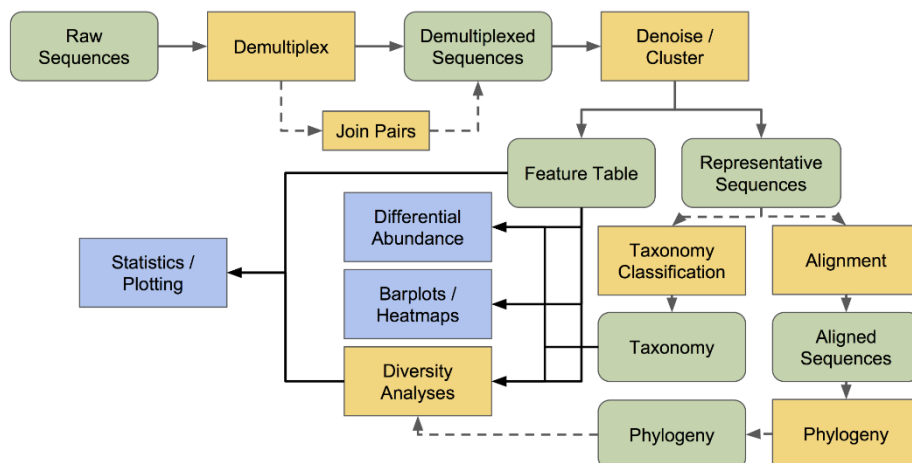


Figura 8. Pipeline de análisis bioinformático del 16S rRNA. Se muestran los pasos para obtener la interpretación de las taxonomías identificadas en los estudios de microbioma. Una vez recogida la muestras, la extracción de ADN, la preparación de librerías de NGS y la secuenciación del 16S rRNA, se realiza el análisis bioinformático mediante los procesos descritos en el diagrama. Este análisis de los datos se realiza con el software QIIME. *Imagen adaptada de Bolyen E, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology 37: 852–857.*

2.2. CONCEPTO DE BIODIVERSIDAD

La biodiversidad, se define como la variedad de especies distintas de los organismos que forman parte de un ecosistema, teniendo en cuenta su relación y coexistencia así como sus interacciones con el medio. Los microorganismos nunca están solos. Ellos viven en comunidades, a menudo compuestas por un número enorme de tipos diferentes de especies. El estudio de las comunidades microbianas y su interacción con su entorno son aspectos claves para comprender el papel y funcionamiento de los microorganismos en un determinado ecosistema. Gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva, las bacterias pueden estudiarse a través de sus genomas evitando la necesidad de cultivar los microorganismos y permitiendo un estudio real de los ecosistemas. Existen tres tipos distintos de formas de estudiar la biodiversidad, principalmente: Diversidad alfa, beta y gamma expuestas a continuación.

2.2.1 Diversidad Alfa(α)

La diversidad alfa, se definió como el número de especies presentes en un hábitat o ecosistema determinado [149]. Actualmente se estudia la α -diversidad mediante distintos parámetros, con el fin de inferir la riqueza o la diversidad biológica de un hábitat. La riqueza de una comunidad, se mide mediante el número de especies observadas, representado con el índice de Chao1 y el ACE. Mientras que, la diversidad, se mide mediante el índice de Shannon, el de Simpson y el alfa de Fisher. El índice de Shannon también llamado Shannon-Weaver o Shannon–Wiener, es el más usado en la literatura en estudios del microbioma (108). Mide la probabilidad de seleccionar todas las especies en la proporción con que existen en la población. Este índice se representa normalmente como H' y se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0,5 y 5, aunque su valor normal está entre 2 y 3; valores inferiores a 2 se consideran bajos en diversidad y superiores a 3 son altos en diversidad de especies. Es interpretado como la probabilidad de un encuentro intraespecífico, esto quiere decir la probabilidad de que si se toman dos individuos al azar de la comunidad ambos pertenezcan a la misma especie. Como estimador de diversidad e independiente al número de especies existe el Índice de Equidad de Pielou (J') que mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada. Su valor va de 0 a 1, de forma que 1 corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes y el 0 señala la ausencia de uniformidad (109). También existe el índice de Simpson que mide la probabilidad de que si tomas dos individuos al azar de la comunidad ambos sean de la misma especie. Mientras más alta es esta probabilidad menos diversa es la comunidad, es decir, cuanto menor sea el índice de Simpson, mayor es la diversidad del hábitat (110). El índice de Simpson (D) tiene la tendencia de ser más pequeño cuando

la comunidad es más *diversa*. Para interpretar este índice más fácilmente, se suele utilizar la inversa de dicho índice (1/Simpson).

Finalmente, el índice alfa de Fisher, mide la relación entre el número de individuos y de especies presentes en un ecosistema. Es decir, como se distribuye el número total de especies entre las distintas muestras tomadas del mismo hábitat, siendo independiente al tamaño muestral, lo que hace muy útil en la identificación de especies menos abundantes (111).

Como se ha comentado anteriormente, la riqueza se mide con los índices de Chao1 y ACE para modelos no paramétricos (datos no ajustados a la curva normal). Así, el índice Chao1, tiene en cuenta aquellas especies que se observan en una o dos muestras del total, siendo muy útil para conjuntos de datos con poblaciones de baja abundancia (112). Es un estimador (de número de especies posibles en una superficie muestreada) basado en abundancias, con lo que se intenta predecir el número de especies probables a encontrar en un hábitat. En cambio, el índice ACE informa sobre especies que se observan en menos de 10 muestras independientes, del mismo hábitat (113). Ambos parámetros subestiman la riqueza en conjuntos de datos con un bajo tamaño muestral, por lo que, en estos casos, combinar los análisis con el total de especies observadas es muy útil para la estimación de la riqueza de un ecosistema.

2.2.2 Beta diversidad (β)

La diversidad Beta, refleja las diferencias entre las comunidades locales que hay en la región. Es decir, mide las unidades taxonómicas de cada especie encontradas entre dos hábitats distintos o en el mismo hábitat a diferentes tiempos. Cuanto mayor es la medida

de β -diversidad, menor será el número de especies compartidas entre los distintos hábitats (114). La β -diversidad se mide utilizando coeficientes de disimilitud, también llamados distancias. Una de las más utilizadas es el análisis de distancias de Bray-Curtis, que se calcula como la diferencia total en la abundancia de especies entre dos hábitats, dividido para la abundancia total en cada sitio. Estas distancias Bray-Curtis, se representan con el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), donde las muestras más similares se agrupan en distancias próximas y las más disimilares se agruparán en distancias más grandes entre ellas (115). Otro tipo de cálculo de distancias en la diversidad beta son las Unifrac que, incorporan las distancias filogenéticas entre los organismos observados, lo que permite observar la homología entre los organismos que forman las distintas comunidades. Cuando se tienen registradas las especies de dos comunidades entre las cuales se desea calcular la beta-diversidad, se puede obtener el cociente entre el número de especies distintas y el número de especies total considerando el conjunto de ambas comunidades (115)

En los estudios de microbioma los índices alfa y beta son los mas usados. A continuación, se muestra un ejemplo de la representación grafica que se obtiene de los cálculos de los respectivos índices alfa y beta en la figura 9.

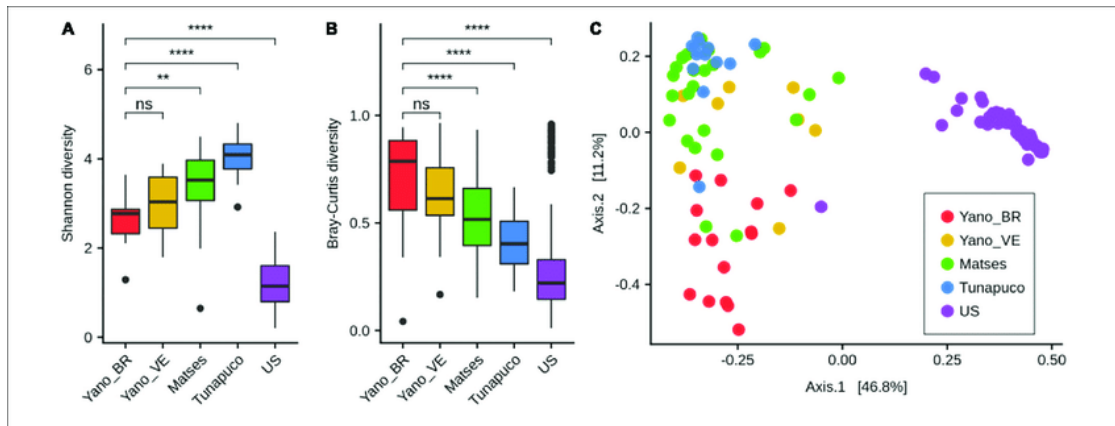


Figura 9. Ejemplo de los gráficos en un estudio de microbioma que se obtiene de las diversidades alfa y beta. Comparaciones de diversidad alfa y beta de los microbiomas intestinales de diferentes grupos. Los análisis se realizaron en tablas de taxones a nivel de género. ns, no significativo; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$ (prueba de Wilcoxon). (A) Diagrama de caja de la diversidad de Shannon de cada grupo. En este ejemplo se muestra como US tiene la diversidad de Shannon mas baja lo que significa que tiene menor diversidad que el resto con *p*valor estadísticamente significativo. (B) Distancias Bray-Curtis dentro de cada grupo, en el ejemplo se muestra que todos los grupos excepto Yano_BR y Yano_VE tiene disimilitudes estadísticamente significativas. (C) Análisis de coordenadas principales de distancias Bray-Curtis. Se observa en el grafico las distancias de disimilitud calculadas con Bray curtis en 2 ejes que representan las distancias en la diversidad beta entre grupos. Los colores de los diagramas de caja y los puntos representan los diferentes grupos analizados según la leyenda. Yano_BR, Yanomami/Brasil; Yano_VE, Yanomami/Venezuela; EE. UU., personas de EE. UU. *Imagen adaptada del estudio: Assarsson M, Duvetorp A, Dienus O, Söderman J, Seifert O. Significant Changes in the Skin Microbiome in Patients with Chronic Plaque Psoriasis after Treatment with Narrowband Ultraviolet B. Acta Derm Venereol. 2018 Apr 16;98(4):428-436.*

2.2.3 Gamma diversidad (γ)

La gamma-diversidad o diversidad regional mide el número de especies del conjunto de comunidades que integran un conjunto de ecosistemas y que interactúan y se repiten de forma similar, como por ejemplo el conjunto de comunidades que habitan el cuerpo humano.

Sin embargo, esta medida no permite conocer si la diversidad observada se debe a la presencia de comunidades poco o muy distintas entre sí o más o menos ricas. Entre estas comunidades, existe un flujo de transmisión de poblaciones, habiendo localizaciones de emisión y localizaciones receptoras (116).

La diversidad biológica puede medirse a nivel local (diversidad alfa) o regional (diversidad gamma), y la relación entre ambas diversidades (gamma / alfa) es la diversidad beta, que refleja las diferencias entre las comunidades biológicas locales que hay en la región.

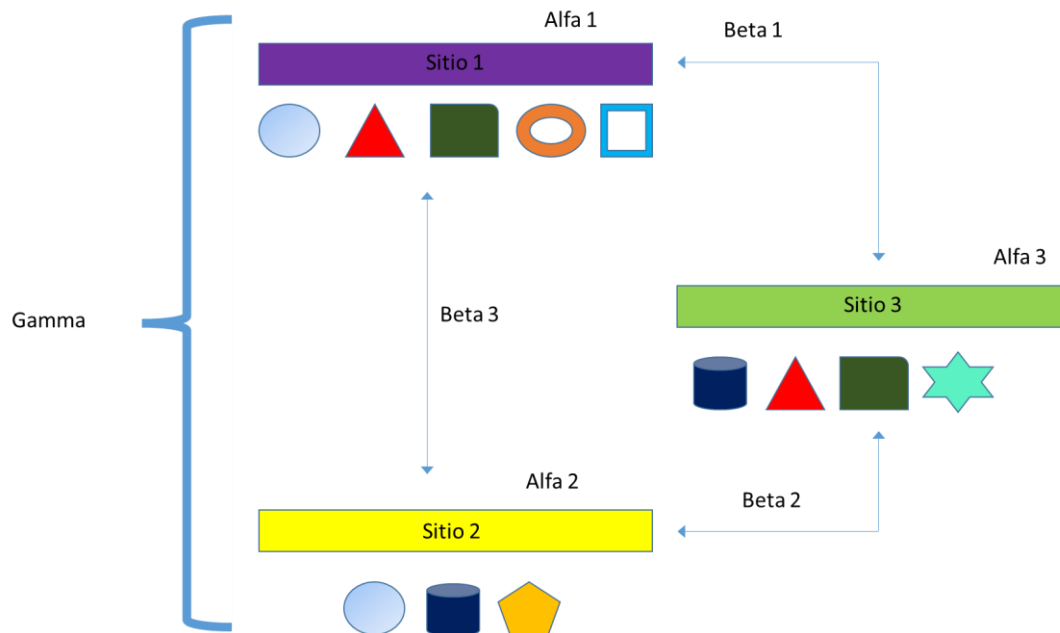


Figura 10. Tipos de diversidad ecológica. Se muestran 3 medios distintos (Sitio 1, 2 y 3) de un mismo entorno. Cada medio contiene diferentes especies ilustradas con figuras geométricas de formas distintas. La interacción entre sitios indica el número de especies que comparten los medios entre sí. Con relación a la diversidad alfa el sitio 1 presentó mayor diversidad al tener mayor número de especies diferentes y mayor riqueza al tener el mayor número total de especies, es decir, mayor beta diversidad. El sitio 1 presenta una mayor diversidad que el sitio 3 al compartir solo 2 de las 5 especies distintas y mayor diversidad que el sitio 2 al compartir solo 1 de las 5 especies distintas, por otra parte, el sitio 3 presentó una mayor diversidad beta y alfa respecto al sitio 2. La diversidad gamma corresponde al número de especies en conjunto del sitio 1, 2 y 3. Imagen propia Ruben Lopez-Aladid.

5.2.4 Inferencia metabólica en base a la diversidad microbiana

La inferencia estadística es el conjunto de métodos que se dedica a la generación de los modelos y predicciones asociadas, en este caso, a las rutas metabólicas de bases públicas teniendo en cuenta la aleatoriedad de las observaciones. Esta inferencia metabólica se usa

mediante la caracterización de las comunidades, secuenciando genes que están altamente conservados como el *16S rRNA* con el fin de predecir las rutas metabólicas predominantes según las poblaciones microbianas de la muestra. Se han desarrollado herramientas que buscan inferir los perfiles metabólicos de las comunidades partiendo únicamente del uso del gen *16S rRNA*. La herramienta más usada es PICRUS_t, estos algoritmos, infieren las capacidades metabólicas de la comunidad a partir del *16S rRNA*. PICRUS_t, permite la entrada de OTUs o ASVs (del inglés Amplicon Sequence Variants), estos últimos tienen una resolución más fina, lo que permite distinguir a los organismos que están más relacionados (117). El posicionamiento filogenético de PICRUS_t2, se basa en la salida de tres herramientas: 1) HMMER para ubicar a los ASVs o OTUs, 2) EPA-ng que determina el posicionamiento óptimo de nuestras secuencias en la filogenia de referencia y 3) GAPPa que da como resultado un árbol que contiene ambos, los genomas de referencia y los organismos muestreados ambientalmente.

Al incrementar la diversidad, las predicciones de las familias de genes reportadas en la base de datos de familias de genes y genomas de la enciclopedia de Kyoto (KEGG), ortólogos (KOs) y números de la comisión de enzimas (EC) también aumenta. Estas representan actividades metabólicas de alto nivel como utilización de la glucosa y desnitrificación, que son anotadas como presentes o ausentes en cada uno de los genomas de referencia (111). PICRUS_t permite seleccionar genomas para ser usados en el análisis, para generar predicciones metabólicas, así como, la identificación de las funciones principales y las implicaciones ecológicas de los microorganismos que componen a la comunidad basados únicamente en los amplicones del gen *16S rRNA* (119)

2.3 DEFINICIÓN DEL MICROBIOMA Y LA MICROBIOTA

El término **microbiota** hace referencia al grupo de microorganismos diferentes que viven en conjunto en un hábitat, por ejemplo, en los intestinos de los seres humanos o en el suelo. Por otro lado, el término **microbioma** describe una comunidad de diferentes microorganismos que ocupa un entorno particular, y también se refiere a la manera en que estos interactúan entre sí y con las condiciones ambientales circundantes (120). La microbiota normal cumple con múltiples funciones, como las endocrinas, la señalización neurológica, la modificación de la densidad mineral ósea, la maduración del sistema inmune, la inhibición de patógenos, la síntesis de vitaminas (K, B₁₂ y folato), el metabolismo de las sales biliares y la modulación de algunos fármacos.

Las relaciones simbióticas entre microorganismos se han dado a lo largo de la historia de la vida. La teoría de la endosimbiosis, propuesta por la bióloga Lynn Margulis, describe la aparición de las células eucariotas como una simbiosis entre bacterias aerobias y arqueas. Expone que los orgánulos subcelulares energéticos (mitocondrias y cloroplastos) provienen de proteobacterias, que fueron englobadas por una arquea, convirtiéndose en eucariota (121).

En cambio existen otro tipo de relaciones: el mutualismo es cuando ambos organismos se benefician; el comensalismo, donde uno de los organismos se beneficia y el otro no se ve afectado por la colaboración y el parasitismo, donde uno de los organismos se beneficia de la relación, perjudicando directamente al otro organismo implicado. Existen organismos mutualistas con su hospedador, pero que bajo la influencia de un entorno determinado pueden producir enfermedad y convertirse en patógenos, dichos organismos reciben el nombre de patobiontes.

3.4 DEFINICIÓN DE DISBIOSIS

También denominada disbacteriosis, hace referencia a un desequilibrio en el número o tipo de colonias microbianas que han colonizado un ecosistema. Se da más en el tracto digestivo, pero puede producirse en cualquier parte en la que haya una superficie expuesta o una membrana mucosa. La disbiosis puede afectar a la digestión, absorción de nutrientes, producción de vitaminas y control de microorganismos dañinos. Numerosos factores, entre ellos los cambios de hábitos alimenticios o los tratamientos antibióticos, pueden influir en el delicado equilibrio microbiano y provocar por tanto una disbiosis. La disbiosis podría desempeñar un papel crucial en las enfermedades respiratorias crónicas.

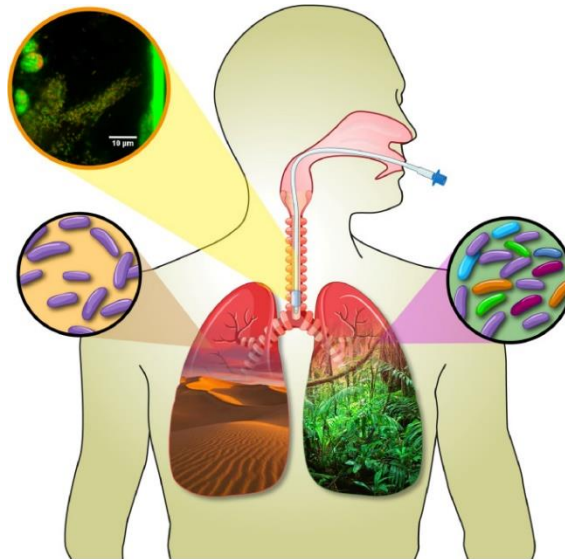


Figura 11. Representación de la disbiosis respiratoria. En el pulmón de la izquierda se puede observar una pérdida de biodiversidad microbiana representada por un desierto que simboliza la desaparición de gran parte de la flora habitual respiratoria tras la colonización por un patógeno. A la derecha se observa un pulmón con una gran diversidad microbiana representada por una selva que simboliza un pulmón sano y una correcta homeostasi microbiana. *Imagen adaptada de Fernández-Barat L, López-Aladid R, Torres A. Reconsidering ventilator-associated pneumonia from a new dimension of the lung microbiome. EBioMedicine. 2020 Oct;60:102995.*

2.5 MICROBIOMA RESPIRATORIO

Estas tecnologías de análisis del *16S rRNA* han permitido un gran avance en la comprensión de la microbiología pulmonar en la enfermedad de las bronquiectasias.

Numerosos estudios intentaron encontrar una correlación entre síntomas, inflamación y microbioma de las vías respiratorias. Entre otros, un estudio de Rogers *et al.* informaron una significativa correlación entre la función pulmonar y la diversidad bacteriana, pero también entre síntomas específicos y un taxón microbiano particular, que muestra el potencial del microbioma como biomarcador en enfermedades respiratorias (51). Demostraron que la microbiota pulmonar es escasa, crece en un ambiente pobre en nutrientes y está en constante recambio, debido a la función pulmonar (tos, aclaramiento mucociliar, mecanismo de defensa del huésped) y la migración desde el tracto respiratorio superior y la dispersión de la mucosa (98, 99). Además, la edad, la genética y el medio ambiente contribuyen a la variabilidad individual y la evolución constante a lo largo de la vida. En la Figura 9 se muestran los géneros en pulmones sanos (izquierda de la figura) respecto a pulmones con enfermedades respiratorias crónicas (derecha de la imagen). Los principales géneros en pulmones sanos son *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que a nivel de género predominan *Streptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella*, con menores aportes de *Haemophilus* y *Neisseria* (96).

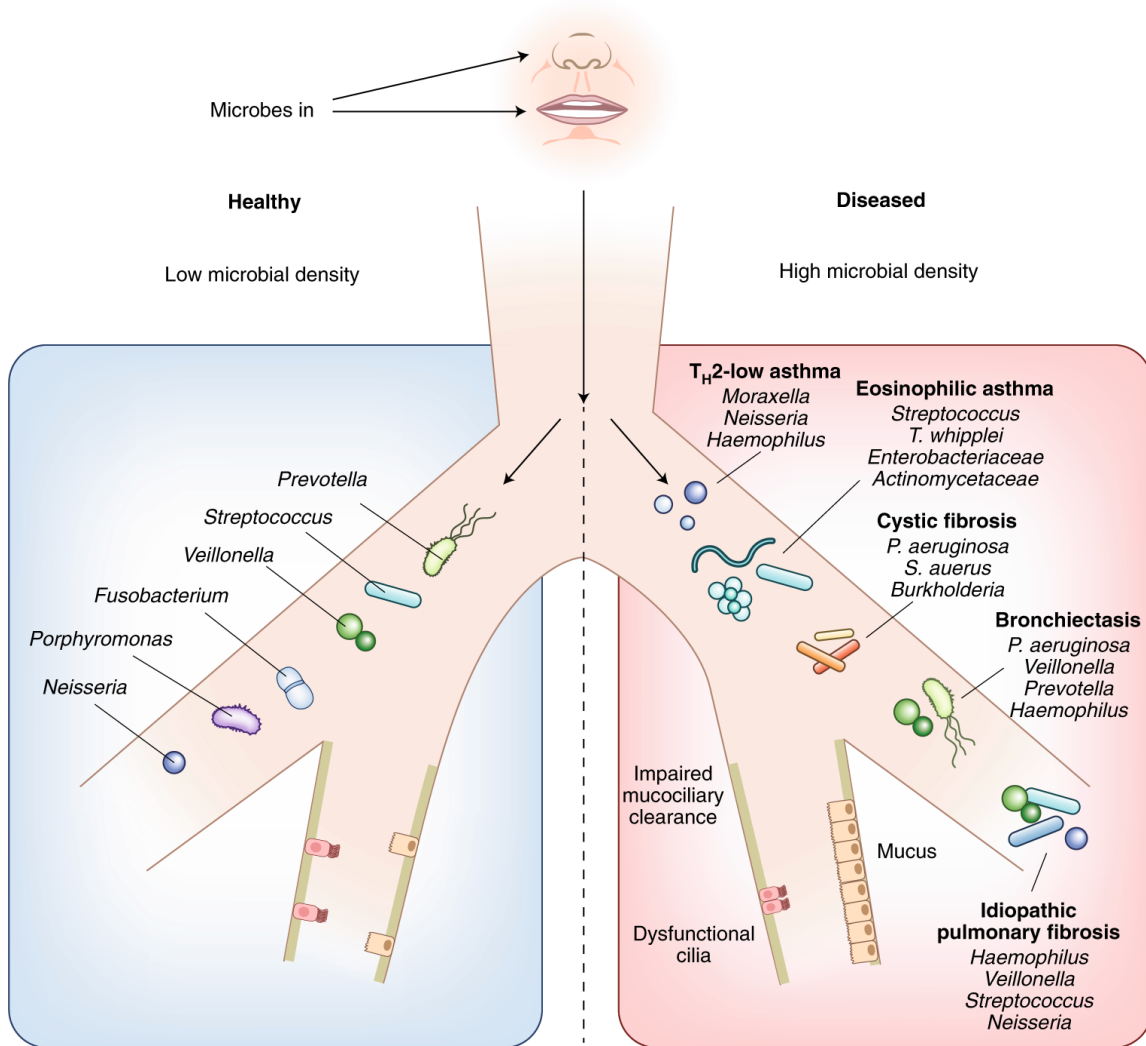


Figura 12. Comparación de la densidad microbiana entre pulmones sanos y pulmones con enfermedad. La figura muestra como aumenta la carga bacteriana total a medida que disminuye la diversidad en la enfermedad respiratoria crónica.

La microbiota de las vías respiratorias juega un papel crucial en el desarrollo, progresión y agudización de las enfermedades pulmonares. De hecho, la estructura alterada del pulmón, el curso de la enfermedad y el uso crónico de tratamientos pueden desencadenar cambios en las condiciones de crecimiento regional, lo que lleva a alteraciones en el microbioma también conocidas como disbiosis.

El pulmón siempre se ha considerado estéril. Sin embargo, como decíamos, el campo de la microbiota pulmonar se ha visto revolucionado por el avance de las técnicas

moleculares. Estos mostraron que la microbiota pulmonar es escasa, crece en un ambiente pobre en nutrientes y está en constante recambio, debido a la función pulmonar (tos, aclaramiento mucociliar, mecanismo de defensa del huésped) y la migración desde el tracto respiratorio superior y la dispersión de la mucosa (99). Además, la edad, la genética y el entorno contribuyen a la variabilidad individual y la evolución constante a lo largo de la vida. Los principales géneros en pulmones sanos son *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que a nivel de género predominan *Streptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella*, con menores aportes de *Haemophilus* y *Neisseria* (18). Además, crece la evidencia sobre la colonización de virus y hongos en el tracto respiratorio de personas sanas y enfermas.

Las tecnologías de secuenciación de ADN han cambiado la comprensión de la microbiología pulmonar en las bronquiectasias. La importancia de caracterizar el microbioma se basa en su relación con las características clínicas, su papel en la orientación del tratamiento y el resultado de la enfermedad. Según el Registro Europeo de Bronquiectasias (EMBARC), *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae* son las bacterias más comunes detectadas en las vías respiratorias bronquiectásicas, junto con *Veillonella* y *Streptococcus*. Este predominio de taxones suele estar asociado con una pérdida de diversidad bacteriana (46). Otros patógenos, incluidos hongos, micobacterias y virus, pueden colonizar y / o infectar a pacientes con bronquiectasias(10).

Tanto *Haemophilus influenzae* como *Pseudomonas aeruginosa* están asociados con un aumento de la inflamación pulmonar. La inflamación crónica de las bronquiectasias es impulsada principalmente por los neutrófilos, que se encuentran tanto en estados estables como durante las agudizaciones (122). La infección crónica por PA del tracto respiratorio se asocia con una mayor inflamación de los neutrófilos, una peor función pulmonar (en

forma de limitación grave del flujo de aire) y un aumento de la mortalidad (123). Más particularmente, la colonización crónica por PA no mucoide podría conducir a su conversión en un fenotipo mucoide específico. Un estudio reciente mostró que la presencia de PA mucoide en el microbioma se asoció con una gravedad más importante, aumentando la frecuencia de agudizaciones y el número de lóbulos afectados(124). Según un estudio realizado por nuestro grupo de enfermedades respiratorias de IDIBAPS, estos hechos pueden explicarse por su propiedad de alterar el esputo, siendo más viscoso y rígido y dando lugar a un pobre aclaramiento mucociliar. Por lo tanto, la mucoidía es un símbolo de colonización crónica y puede estar asociada con el fracaso de la terapia de erradicación de PA(124,125).

Además, algunos estudios intentaron encontrar una correlación entre los síntomas, la inflamación y el microbioma de las vías respiratorias. Uno de ellos informó una correlación significativa entre la función pulmonar y la diversidad bacteriana, y también entre la tos y un taxón microbiano específico, mostrando el potencial del microbioma como un biomarcador de enfermedad (126). Durante el curso de la enfermedad de las bronquiectasias, los pacientes pueden también experimentar agudizaciones agudas asociadas con un aumento de la inflamación y la progresión del daño pulmonar. Son eventos complejos que pueden explicarse por el crecimiento excesivo de bacterias, pero también incluyen la interacción con el entorno circundante y / o la coinfección (127).

La composición y la carga bacteriana parecen permanecer relativamente estables en términos de cantidad y diversidad bacterianas cuando se comparan la enfermedad inicial y las agudizaciones. Estas últimas podrían estar relacionadas con el comportamiento microbiano dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, la tensión de oxígeno o la inmunidad del huésped entre otras causas (128). Así, el microbioma de los pacientes con

bronquiectasias permanece estable a pesar de las agudizaciones, pero también a pesar del tratamiento con antibióticos: *Pseudomona aeruginosa* y *Haemophilus influenzae* siguen siendo los taxones dominantes (129). Además, el uso prolongado de antibióticos con eritromicina podría disminuir la frecuencia de agudización de las bronquiectasias, al provocar un aumento de *Haemophilus influenzae*, particularmente en pacientes con predominio de *Pseudomonas aeruginosa*.

En aquellos sin dominancia de *Pseudomona*, el tratamiento disminuyó la abundancia de *Haemophilus influenzae*. Esta es la razón por la que la antibioticoterapia a largo plazo es uno de los pilares del tratamiento para el manejo de las bronquiectasias con agudizaciones frecuentes, y se recomienda principalmente en pacientes con infección crónica por *Pseudomona* (127,128).

Se dispone de datos limitados sobre el impacto de virus, hongos y micobacterias de acuerdo con las directrices de la British Thoracic Society de 2019. En otras enfermedades respiratorias como la EPOC o el asma, el papel de los virus como factores desencadenantes de las agudizaciones está bien definido (75). Sin embargo, la falta de un marcador molecular viral universal, como el *16S rRNA*, representa un desafío importante para identificar y comprender el viroma. El papel de los hongos en las bronquiectasias tampoco está claro: la mayoría de los estudios consideran la presencia de hongos como algo incidental. Sin embargo, *Aspergillus* parece ser el hongo más común aislado en el esputo, y su presencia se correlaciona con agudizaciones, siendo el mecanismo aún poco claro. Otros hongos comunes identificados en el tracto respiratorio de los pacientes son *Cryptococcus*, *Clavisspora* y *Candida* (130).

La composición de la microbiota y el gradiente de biodiversidad disminuyen en las vías respiratorias bajas. El entorno de los pulmones es pobre en nutrientes y hay un recambio

constante debido a las barreras naturales para la homeostasis del microbioma (tos, depuración mucociliar y mecanismos de defensa del huésped) (3,4). Los principales filos en pulmones sanos son *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, predominando los géneros *Streptococcus*, *Prevotella* y *Veillonella* y los géneros *Haemophilus* y *Neisseria* mostrando menor abundancia (10).

En la actualidad, la metagenómica *16S rRNA* está demostrando su utilidad en el campo de la microbiología. La secuenciación del gen *16S rRNA* es el método más común utilizado para detectar genes en el estudio de la filogenia y taxonomía bacteriana (97). La identificación genómica de patógenos podría reemplazar su caracterización convencional por morfología, tinción y criterios metabólicos, mejorando el diagnóstico de infecciones, así como los resultados clínicos de los pacientes (96). Además, las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) pueden proporcionar información adicional sobre la sensibilidad y la resistencia a los medicamentos, las relaciones con otros patógenos, así como sus funciones en un organismo sano y en la fisiopatología. NGS supera las limitaciones de los cultivos bacterianos estándar de atención (SOC) y ofrece una imagen real no solo de las bacterias dominantes, sino también de las otras bacterias menos abundantes. Esta perspectiva ecológica y sus implicaciones clínicas se han convertido en un desafío actual en el campo de las enfermedades infecciosas (131).

Las variaciones técnicas entre estudios, como en los protocolos para la extracción de ADN, los cebadores que se seleccionan, las condiciones de PCR empleadas, las regiones hipervariables evaluadas y las plataformas de secuenciación utilizadas, tienen un impacto significativo en la determinación de la estructura de la microbiota (132,133).

Dependiendo de las regiones hipervariables utilizadas para el perfilado de *16S rRNA*, se obtienen diferentes resoluciones taxonómicas en cada nicho ecológico. Si bien una región puede ser adecuada para un entorno específico, es posible que no sea tan precisa para otro diferente. Por ejemplo, la región V1 (nucleótidos 69-99) puede usarse para identificar *Streptococcus sp.* y para diferenciar entre *Staphylococcus aureus* y las especies de *Staphylococcus coagulasa-negativo* (CONS)(134,135).

Las regiones V4, V5 y V6 tienen la mayor funcionalidad en el ribosoma y por lo tanto son las más conservadas, especialmente la región V4 (12). Las regiones V2 y V8 tienen una función estructural, con poca funcionalidad en el ribosoma (133).

A las regiones V3 y V7 no se les ha asignado ningún rol ni funcionalidad. Por lo tanto, presentan la mayor variabilidad genética (igual que V2 y V8). Se ha sugerido el uso combinado de dos o más regiones hipervariables para aumentar el poder de resolución en la identificación de bacterias a nivel de género (136). Sin embargo, faltan métodos estandarizados para muestras respiratorias que utilicen varias regiones hipervariables para evaluar los límites de diversidad y riqueza de cada región sin los efectos de sesgos técnicos.

Por lo tanto, el objetivo del estudio 1 de esta tesis fue comparar todas las regiones hipervariables combinadas (V1-V2, V3-V4, V5-V7 y V7-V9) para optimizar el análisis del microbioma del esputo en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas.

2.7 DISBIOSIS PULMONAR EN BRONQUIECTASIAS

La bronquiectasia es un trastorno crónico caracterizado por una dilatación progresiva e irreversible de los bronquios. Estas alteraciones conducen a una disbiosis pulmonar caracterizada por una pérdida de diversidad de la flora concomitante del pulmón (137).

2.7.1 Enfermedad estable

El microbioma pulmonar en las bronquiectasias se ha estudiado menos en comparación con el de la EPOC. El análisis de esputo de pacientes con bronquiectasias mostró predominio de *Haemophilus* y *Pseudomonas* (*Proteobacterias*), *Veillonella* y *Streptococcus* (*Firmicutes*) (138). Los microbiomas dominantes de *Haemophilus* parecen asociarse con una enfermedad menos grave, en contraste con *Pseudomonas*, que se asocia con una enfermedad más grave, una función pulmonar y un resultado clínico más deficientes. De hecho, la presencia persistente de *Pseudomonas* en estos pacientes se asocia con inflamación neutrofílica(139).

Un estudio intentó asociar la presentación clínica de las bronquiectasias con el microbioma de las vías respiratorias (37). Se ha informado de una correlación significativa entre la tos y las comunidades bacterianas: este síntoma podría estar asociado con un taxón microbiano específico y puede predecir la progresión de la enfermedad. Además, el mismo estudio observó una correlación positiva entre la función pulmonar (FEV1) y la diversidad bacteriana (127).

2.7.2 Eventos agudos

Las agudizaciones de las bronquiectasias pueden ser causadas por bacterias, virus y factores ambientales, lo que dificulta determinar el papel del microbioma en ellas (87). No se han demostrado asociaciones consistentes entre agudizaciones y alteraciones en la composición y carga bacteriana. Dichas agudizaciones podrían estar relacionadas más bien con el comportamiento microbiano impulsado por la disponibilidad de nutrientes, la tensión de oxígeno, los bacteriófagos, la inmunidad del huésped, etc (140).

El micobioma (estudio de poblaciones fúngicas) también juega un papel en el resultado

de las bronquiectasias: *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Clavispora* son los géneros más comunes en comparación con los individuos sanos. Los hongos más frecuentemente aislados son *Aspergillus* y están relacionados con una mayor frecuencia de agudizaciones (141).

Finalmente, el papel del viroma sigue siendo incierto: se sabe que los virus respiratorios están asociados con la inflamación sistémica y de las vías respiratorias, pero se requieren más estudios para comprender su papel en el desarrollo y progresión de las bronquiectasias, así como sus interacciones con bacterias y hongos (142).

2.6 DISBIOSIS PULMONAR EN EPOC

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad pulmonar debilitante que incluye la obstrucción de las vías respiratorias pequeñas y enfisema, lo que lleva a la pérdida de la función pulmonar. Se asocia con inflamación crónica y mecanismos de reparación anormales, pero su patogenia sigue siendo poco conocida. La creciente evidencia sugiere que la microbiota pulmonar juega un papel importante en la EPOC y numerosos estudios han reportado diferencias en la microbiota entre estados sanos y enfermos, así como durante el curso de la enfermedad (143).

2.6.1 EPOC estable

En primer lugar, los estudios de muestras de esputo de pacientes con EPOC encontraron una disminución de la diversidad del microbioma en comparación con los sujetos sanos, con diferencias en la composición de la microbiota. Estos cambios aumentan a medida que avanza la enfermedad y durante las agudizaciones agudas (144–146). Los filos microbianos dominantes en la EPOC estable incluyen *Proteobacteria* (*Haemophilus*,

Pseudomonas, *Moraxella*), *Firmicutes* (*Veillonella*, *Streptococcus*), *Bacteroidetes* (*Prevotella*) y *Actinobacteria*.

Más específicamente, estos pacientes se caracterizan por un aumento de *Proteobacteria* y una reducción de *Bacteroidetes* en comparación con los controles sanos (145,146). Este hecho, asociado a la pérdida de diversidad, es un predictor de peor pronóstico.

El papel preciso del microbioma en la patogénesis de la EPOC sigue sin estar claro, pero algunos estudios mostraron que las condiciones ambientales alteradas podrían alterar la composición de la comunidad microbiana, que a su vez induce una respuesta inmune desregulada del huésped a través de metabolitos bacterianos y factores de virulencia, lo que lleva a una pérdida de función pulmonar. Sin embargo, se desconoce si la disbiosis contribuye a la obstrucción pulmonar generada por el tabaquismo u otros ambientes tóxicos o si bien es la consecuencia de la enfermedad (127). Estudios recientes también implican que los cambios en la fisiología intestinal contribuyen a la patogénesis de la EPOC(147).

El tratamiento estable de la EPOC juega un papel en los cambios bacterianos: el uso prolongado de corticosteroides inhalados aumenta la carga bacteriana (*Proteobacteria*), particularmente en pacientes con niveles bajos de eosinófilos en sangre (<2%), mientras que se observa un aumento en la carga de *Bacteroidetes* en pacientes que usan broncodilatadores con monoterapia con beta-agonistas de acción conocidos como “Long Acting Beta Agonist” (LABA) (148). El beneficio del tratamiento con antibióticos durante la fase estable es controvertido, ya que puede causar una pérdida de diversidad que puede desencadenar un mayor riesgo de agudizaciones y progresión de la enfermedad (148)

2.6.2 Eventos agudos

El aumento del número de agudizaciones agudas (AECOPD) se asocia con un peor pronóstico. Durante muchos años, se pensó que el microbioma pulmonar se alteraba durante los eventos agudos en comparación con las muestras de enfermedad estables (148). Sin embargo, en el estudio citado de Wang et al., informaron que no existen diferencias significativas entre los perfiles de microbioma estable y de agudización en su conjunto. No obstante, las agudizaciones se pueden agrupar en subgrupos de endotipos bacterianos, eosinofílicos y virales, lo que ayuda a diagnosticar e identificar las agudizaciones sintomáticas (medidas mediante la prueba de evaluación de la EPOC, CAT: una puntuación más alta indica síntomas más graves). El concepto “COPD Assessment Test” (CAT) mide el impacto que la EPOC está teniendo en su bienestar y su vida diaria (149).

Las agudizaciones bacterianas se asocian con una pérdida significativa de diversidad y cambios divergentes en la composición general del microbioma, y con una puntuación CAT más alta. Por el contrario, el endotipo eosinofílico no experimenta cambios significativos en la composición del microbioma. Las agudizaciones de virus a menudo se asocian con infecciones bacterianas y aumento de eosinófilos. Estos hallazgos subrayan la importancia de un enfoque personalizado del tratamiento (150). Al igual que la EPOC estable, los tratamientos administrados durante los episodios de agudizaciones influyen en el microbioma: los antibióticos se asocian con una diversidad menor de *Proteobacterias*, mientras que el tratamiento sistémico con corticosteroides puede reducir la diversidad microbiana aumentando la carga de *Proteobacterias* y *Firmicutes* (144,151). Estos efectos persisten hasta la recuperación completa, es decir hasta que se reestablece la homeostasi microbiana tras finalizar el tratamiento. Actualmente el impacto de los

antibióticos esta en vías de investigación pero estudios como el de Jacobs M et al., sugieren que la interrupción de la microbiota inducida por antibióticos se asocia con alteraciones en las respuestas del huésped durante la inflamación pulmonar inducida por LPS(152) .

Sabiendo que la composición del microbioma está asociada con el resultado clínico, el cultivo de esputo se utiliza actualmente para orientar las decisiones de tratamiento con antibióticos en AECOPD (a pesar de su limitación para diferenciar la infección aguda de la colonización crónica).

Las técnicas de secuenciación del microbioma pueden ayudar a orientar la elección de antibióticos, proporcionando información adicional sobre diversidad, composición y variabilidad. Finalmente comentar que la manipulación de la microbiota pulmonar puede corregir la disbiosis, mediante probióticos (*Lactobacillus*) y dieta (153). Actualmente, existe un ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado y controlado para estudiar la eficacia y la seguridad de los probióticos orales, la amikacina inhalada en aerosol para prevenir la exacerbación aguda de la EPOC. El ensayo clínico ha finalizado la fase I y se puede encontrar en la URL descrita a continuación.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03449459?term=probiotics&cond=Copd&draw=2&rank=2>).

2.8 MICROBIOMA BRONQUIECTASIAS-EPOC (BQO)

Es común encontrar una coexistencia entre bronquiectasias y EPOC, lo que se asocia a mayor gravedad de la enfermedad y peor pronóstico. Definir BQO sigue siendo un desafío a pesar de su reconocimiento en la práctica clínica, y el papel del microbioma sigue sin estar claro y poco estudiado.

En el estudio AERIS COPD, el estudio de la composición del microbioma en el subgrupo BCO muestra un aumento de *Haemophilus* sin diferencias durante las agudizaciones. Es necesario seguir trabajando para definir el BCO y el papel del microbioma en este estado clínico (69). El papel del microbioma, en particular de *Aspergillus* en el desarrollo de la BQO podría estar infravalorado (141).

2.9 DIFERENCIAS EN LOS MICROBIOMAS BQ-EPOC

En ambos casos, los microbiomas característicos de las vías respiratorias se alteran en comparación con los individuos no enfermos (sanos) y tienen una correlación directa con el pronóstico. En la Tabla 2 se muestran las diferencias del microbioma de EPOC y de BQ respecto a individuos sanos.

Tabla 2. Relaciones entre microbioma y enfermedades respiratorias crónicas EPOC y BQ.

	EPOC	Citas	BQ	Citas
microbiota en comparación con pulmón sano	<p>↑ Proteobacteria (<i>Haemophilus</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Moraxella</i>)</p> <p>↓ Bacteroidetes (<i>Prevotella</i>)</p> <p>↑ Firmicutes (<i>Veillonella</i>, <i>Streptococcus</i>)</p> <p>↑ Actinobacteria</p>	(148)	<p>↑ Proteobacteria (dominancia de <i>Haemophilus</i> and <i>Pseudomonas</i>)</p> <p>↑ Firmicutes (<i>Veillonella</i>, <i>Streptococcus</i>)</p> <p>↑ <i>Aspergillus</i>, <i>Cryptococcus</i>, <i>Clavispora</i></p>	(129)
Correlación Clínica	Endotipo bacteriano: más síntomas severos (↑CAT score)	(150)	<p>Correlación positiva con FEV1</p> <p>Asociación entre tos, síntomas y la taxa específica + la progresión de la enfermedad</p>	(74)
Factores asociados con mal pronóstico	<p>Perdida de la diversidad microbiana</p> <p>↑ Proteobacteria (<i>Haemophilus</i>), ↓ Bacteroidetes</p>	(148)	↑ <i>Pseudomonas</i> ⇒ ↑ inflamación neutrofílica	(154)
Papel del tratamiento	<p><u>Antibiótico: Corticosteroides</u></p> <p>↓ diversidad, ↑ Proteobacteria and Firmicutes</p>	<p>(148)</p> <p>(151)</p>	<u>Antibiotic:</u> Puede ↓ frecuencia de agudizaciones.	(10)

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPOTESIS

La hipótesis de trabajo de la presente tesis doctoral fue:

1. La combinación de diferentes regiones hipervariables de la subunidad *16S rRNA* (RNA ribosomal bacteriano) puede dar diferentes clasificaciones taxonómicas debido a la variabilidad de la conservación de cada región.
2. La carga bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* y su influencia en la disminución de la diversidad de la microbiota respiratoria aún no está claro. Para entender esta la relación se pretende determinar el punto de corte de carga bacteriana del patógeno a partir del cual se establece un ecosistema dominado por el patobionte conformando un patobioma.
3. El fenotipo Mucoide de *Pseudomonas aeruginosa* provoca una mayor disbiosis y disminución de la diversidad que el no mucoide debido a la producción de alginato y la posterior formación de biopelículas. Se desconocen las implicaciones que tienen las biopelículas en la aparición del patobioma.
4. El fenotipo Mucoide respecto al no mucoide estimula diferentes rutas metabólicas en el paciente debido a la cronicidad de los pacientes con fenotipo mucoide.

3.2 OBJETIVOS

Los objetivos principales son:

1. Identificar la combinación de regiones hipervariables con más sensibilidad y especificidad para el estudio metagenómico del 16S rRNA a partir de muestras de esputo (Estudio 1)
 2. Establecer un punto de corte de carga bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* con valor discriminante para identificar el patobioma. (Estudio 2)
 3. Determinar que implicaciones tiene el fenotipo mucoide de la *Pseudomonas aeruginosa* en el microbioma pulmonar y en el establecimiento del patobioma en las bronquiectasias. (Estudio 3)
- 3.1 Inferir las rutas metabólicas diferenciales en el fenotipo mucoide y no mucoide para observar cuales son las predominantes en cada fenotipo. (Estudio 3)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y METODOS

A continuación, se muestran los materiales y métodos que han sido comunes en los tres estudios que se exponen en esta tesis. Una vez explicada esta parte en común se diferenciarán agrupados por cada estudio los que sean específicos del correspondiente estudio.

4.1 Materiales y métodos comunes de los tres estudios.

Diseño del estudio

Este estudio observacional prospectivo (NCT04803695) se realizó en el servicio de neumología de un hospital de tercer nivel y en los laboratorios de investigación CELLEX del IDIBAPS en Barcelona, España. Los pacientes fueron incluidos desde junio de 2017 hasta noviembre de 2020 y seguidos durante 1 año de forma prospectiva. Se realizó una visita cada 3 meses durante la fase estable. En cada visita: 1) se obtuvo una muestra de esputo y otra de sangre, 2) se evaluó la función pulmonar con un espirómetro EasyOne™ World (NDD Medical Technologies, Zúrich, Suiza) y se clasificó según las pautas de la American Thoracic Society/European Respiratory Society; y 3) se realizó el cuestionario de bronquiectasias de calidad de vida (QoL-B) (71). Dentro de las primeras 48h de cada agudización se obtuvieron las mismas muestras. Un número de teléfono estaba disponible las 24 horas, los 7 días de la semana si los pacientes experimentaban algún síntoma de la definición consensuada de agudización(10,159).

Se incluyeron pacientes con bronquiectasias diagnosticadas, por tomografía computarizada, con y sin EPOC, y al menos un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en esputo. Los criterios de exclusión fueron: 1) fibrosis quística; 2) inmunosupresión (primaria y secundaria, a excepción de los casos de deficiencia de IgG en tratamiento de

sustitución estable); 3) sarcoidosis, 4) tuberculosis, 5) infección activa por micobacterias no tuberculosas, 6) enfermedad pulmonar intersticial difusa; 7) estado alterado de conciencia o incapacidad para comprender el estudio y realizar las pruebas previstas por el mismo; 8) participación del paciente en otro estudio de intervención (ensayos clínicos).

El estudio se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki (versión actual, Fortaleza, Brasil, octubre de 2013) y se realizó de acuerdo con los requisitos de la Ley de Investigación Biomédica española de 2007. El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Interna de la institución (número de registro HCB/0236). Escrito el consentimiento informado se obtuvo de todos los pacientes.

Infección crónica en bronquiectasias: 2 o más aislamientos separados por 3 meses durante un año. Con el fin de identificar a aquellos pacientes verdaderamente infectados crónicamente, utilizamos una información retrospectiva y prospectiva para identificar a aquellos pacientes que cumplen con la definición de crónica ya sea retrospectivamente (informado en la historia clínica y microbiológica del paciente) o prospectivamente (durante el seguimiento SOC+cultivos recomendados).). Esta definición de crónico retrospectivo+prospectivo nos permitió identificar con precisión a aquellos pacientes con infección crónica.

Para la presente tesis se recogieron 34 muestras de esputo de pacientes con bronquiectasias desde julio de 2017 hasta octubre de 2019. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado en el Hospital Clinic de Barcelona.

Muestras de esputo y extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó dentro de los 2 meses posteriores a la adquisición del esputo. Luego, las muestras de ADN extraídas se almacenaron a -80 °C antes de la

cuantificación con Qubit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Las muestras de esputo se aislaron utilizando el kit de aislamiento de ADN de esputo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Norgen Corp., ON, Canadá). Los cultivos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* se realizaron en paralelo como método estándar recomendado y todas las muestras de cultivos positivos se incluyeron en este estudio.

Amplificación, creación de librerías por PCR y secuenciación masiva

La preparación de las bibliotecas de ADN se basó en las regiones hipervariables V1-V2, V3-V4, V5-V7 y V7-V9 del gen *16S rRNA* utilizando el QIAseq 16S/ITS Screening Panel (QIAGEN Hilden, Alemania). Las bibliotecas de ADN se crearon y purificaron, con fragmentos cortos (productos no objetivo) eliminados utilizando el kit de perlas AMPure XP (Agencourt Bioscience, Waltham, MA, USA). Dichas bibliotecas se secuenciaron con MiSeq Sequencing Platform utilizando el kit de secuenciación V3 2x300bp “paired end” (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). Se utilizó un control ZymoBIOMICS Microbial Community Standard como control positivo. ZymoBIOMICS nos proporciona información sobre las especies más representativas en su web. (<https://www.zymoresearch.com/collections/zymbiomics-microbial-community-standards/products/zymbiomics-microbial-community-standard>)

Además, de acuerdo con el sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de paneles QIAseq 16S/ITS, kits de índice QIAseq 16S/ITS y control inteligente QIAseq 16S/ITS se prueba según especificaciones predeterminadas para garantizar una calidad uniforme del producto.

El ADN purificado se utilizó como plantilla para la amplificación por PCR con cebadores dirigidos a las diferentes regiones hipervariables del gen *16S rRNA*. El programa de amplificación fue el siguiente. Primero se realizó una desnaturalización a 95 °C durante

5 min, seguida de 20 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s. Los primers fueron templados a 60 °C por 30 s y extendidos a 72 °C por 30 s usando una elongación final a 72 °C por 5 min. Para adjuntar el código de barras del índice QIAGEN, se realizó una amplificación secundaria. Los productos de preparación de la biblioteca se evaluaron en un sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) para determinar la calidad y el tamaño, utilizando el kit DNA 7500.

El conjunto de bibliotecas de ADN se introdujo en la plataforma de secuenciación de MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) para la secuenciación, que se realizó en las instalaciones principales del IDIBAPS. Los archivos obtenidos estaban en formato fastq para análisis bioinformáticos.

El análisis del microbioma implicó los siguientes pasos. Para evaluar los controles de calidad y el filtrado de las lecturas sin procesar se realizó FastQC Versión 0.11.9 en un corte con control de calidad con una puntuación de hasta 30 (155). La eliminación de ruido de las secuencias se realizó con la canalización Deblur, que está destinada a datos finales emparejados, y se extrajeron las lecturas no redundantes. Deblur es un método alternativo al agrupamiento de OTU (un tipo de agrupamiento diferente y más preciso), por lo que se generaron ASV (Amplicon Sequence Variants), no OTU, los parámetros para deblur se recortaron en 250 pb (99,156). La base de datos de *16S rRNA* no quimérico de QIIME 2 versión 2018.8 se utilizó para identificar quimeras en las lecturas, con una tasa de similitud de mejor acierto de menos del 99%. Las asignaciones taxonómicas se obtuvieron utilizando la base de datos Greengenes.

Los datos de secuencia se agruparon utilizando los paquetes R phyloseq y vegan en grupos basados en diferentes regiones, antes de producir cladogramas con los diferentes grupos. Los índices de diversidad alfa (el Chao1, el índice de Shannon y el índice de

Simpson inverso) se estimaron con base en el programa R versión 3.4.1 con paquetes phyloseq y vegan compatibles con la versión R. La diversidad alfa, que está asociada con la riqueza, la uniformidad, la entropía y la dominancia de los ASV, se cuantificó con los índices de diversidad Observed, Fisher, Chao1, Shannon y Simpson inverso. Shannon se relacionó con la uniformidad (por lo tanto, una medida de entropía), Simpson con la dominancia y Chao1 calculó la riqueza. La diversidad alfa se calculó mediante pruebas estadísticas de Kruskal Wallis.

Para analizar la diversidad beta, se calculó el diagrama de tensión y utilizamos un enfoque de escalado multidimensional no métrico (NMDS) basado en métricas de distancia ecológica calculadas por las disimilitudes de Bray-Curtis implementadas en paquetes R (Vegan, metaMDS y ggplot2 paquetes).

Efecto del tamaño del análisis lineal discriminante

El método del tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) mostró los taxones de bacterias significativamente diferentes entre las muestras de tres regiones. Los taxones con abundancias significativamente diferentes entre grupos están representados por colores. Solo se muestran los taxones que alcanzan un umbral significativo de LDA >2. LDA se utiliza para la estimación del tamaño del efecto, ya que nuestros experimentos determinaron que estimaba con mayor precisión la consistencia biológica en comparación con enfoques como las diferencias en las medias/medianas de los grupos (157).

4.2 Materiales y métodos estudio 1: Regiones hipervariables de 16S rRNA con el mayor poder de resolución para la identificación taxonómica en esputo.

Los métodos utilizados de forma común para los 3 estudios han sido previamente

descritos en el punto 4.1, a continuación, se muestran los métodos que fueron específicos de este estudio.

Diseño del estudio

En esta investigación se compararon las identificaciones taxonómicas de las combinaciones de regiones hipervariables presentes en el *16S rRNA* V1V2, V3V4, V5V7 y V7V9). Para evaluar la resolución de cada una de ellas, se utilizó un control microbiano de Zymobiomics con taxonomías conocidas. El objetivo principal fue observar cual era la región más eficiente respecto al grupo control para la identificación taxonómica en muestras de esputo.

Análisis de sensibilidad y especificidad de cada región hipervariable estudiada

Para medir la sensibilidad y especificidad de cada región hipervariable se utilizó el método de curva característica operativa del receptor (ROC) entre las muestras y el control estándar de la comunidad microbiana Zymobiomics para cada región hipervariable con un intervalo de confianza (IC) de 0,95.

4.3 Materiales y métodos estudio 2: La identificación del patobioma agrupado por carga de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con bronquiectasias

Los métodos utilizados de forma común para los 3 estudios han sido previamente descritos en el punto 4.1, a continuación, se muestran los métodos que fueron específicos de este estudio.

Diseño del estudio

En esta investigación se intentó caracterizar el microbioma de los pacientes con bronquiectasias a través de muestras de esputo de alta calidad (Murray *et al* (158).), que se cultivaron en agar para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) de PA. El punto de corte para determinar infección por PA en el esputo, en la práctica clínica es mayor o igual a 6 LogCFU/mL, y se desconoce su relación con la disbiosis microbiana según el valor de LogCFU/mL obtenidos por cultivo. El presente estudio tiene como objetivo estudiar la relación entre el cultivo y la disbiosis microbiana. Queremos ver si los puntos de corte de cultivo para definir infección por PA están asociados con el establecimiento de un patobioma o si, por el contrario, la disbiosis ocurre antes de mayor o igual a LogCFU/mL.

Nuestro principal objetivo fue observar la diversidad, la composición y los patrones microbianos según la carga de PA (carga alta de PA >5 CFU, carga baja de PA <5 CFU).

Se formaron dos grupos según LogCFU/mL: aquellas con LogCFU/mL mayor que 5 se consideraron muestras de alta carga bacteriana, mientras que las que presentan LogCFU/mL menores que 5 se consideraron muestras de baja carga bacteriana.

4.4 Materiales y métodos estudio 3: El patobioma en el fenotipo Mucoide de *Pseudomonas aeruginosa*.

Los métodos utilizados de forma común para los 3 estudios han sido previamente descritos en el punto 4.1, a continuación, se muestran los métodos que fueron específicos de este estudio.

Diseño del estudio

Se caracterizaron por cultivos estándar y cultivos recomendados los fenotipos de PA con el fin de analizar el microbioma asociado al fenotipo mucoide y su implicación en la disbiosis microbiana.

Cultivos estándar de atención “Standard of Care” (SOC) y Gram

Todas las muestras se analizaron mediante cultivos SOC y tinción de Gram en el área de máxima purulencia para buscar leucocitos y células epiteliales y evaluar la calidad de la muestra según los criterios de Murray y Washington. Los cultivos SOC incluyeron sembrar en agar sangre y chocolate e incubar durante 48 h a 37 °C. Se utilizaron la tinción de Ziehl-Neelsen y cultivos líquidos Lowenstein y Mycobacteria Growth Indicator Tube para la detección de Mycobacteria spp que se evaluaron después de 6 semanas. Las pruebas de susceptibilidad se realizaron mediante difusión en disco o E-test, y los patógenos aislados se identificaron mediante MALDI-TOF (160) y se clasificaron como sensibles, intermedios o resistentes según los criterios de EUCAST.

Cultivos recomendados y Gram para biofilms

Solo se procesaron para cultivo muestras de esputo de los grados IV, V o VI de la clasificación de Murray-Washington (158). Se utilizaron ultrasonidos (5 min, 40 kHz) y esputolisina (1:1) antes de cultivar las diluciones (10⁻¹-10⁻⁵) en medios de agar sangre y MacConkey, y se incubaron durante 24-96 ha 37 °C. El crecimiento bacteriano se cuantificó y se informó como la escala logarítmica de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. Se realizó una selección precisa de aislamientos de PA mucoide y no mucoide para cada muestra. Finalmente, los frotis de esputo fueron analizados por Gram para describir la presencia/ausencia de agregados de biopelículas Gram-negativas.

Inferencias metabólicas

Finalmente se realizó un estudio de inferencia estadística mediante Picrust y Metacyc para predecir las rutas metabólicas predominantes según la población microbiana de cada muestra con el fin de encontrar diferentes rutas metabólicas respiratorias predominantes en el fenotipo mucoide y no mucoide en las bases de datos KEGG y metaCyc(117)

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Resultados estudio 1: Regiones hipervariables de 16S rRNA con el mayor poder de resolución para la identificación taxonómica en esputo

Este estudio se basa en variantes de secuencia de amplicón (ASV) que permiten una detección ligeramente más fuerte de la diversidad bacteriana porque las OTU no proporcionan mediciones tan precisas y exactas de la variación de secuencia.

El propósito del FastQC fue obtener secuencias de calidad con Q30 así como observar el número de lecturas en cada muestra, las bases por secuencia, la longitud de la distribución de secuencias y las puntuaciones por secuencia. Durante el control de calidad y preprocesamiento de lecturas de 34 muestras, se obtuvo un promedio de 100 000 secuencias por muestra. En este estudio se obtuvieron 114 taxonomías con 1.568.227 ASVs en cada región. Cada región contenía diferentes taxones (nivel de género), aunque el número total de ASV fue el mismo para todas las regiones hipervariables. Por ejemplo, cada región hipervariable obtuvo diferentes frecuencias relativas para el género *Pseudomonas* de mayor a menor V1V2, V3V4, V5V7 y V7V9, respectivamente representados en la Figura 13, en concordancia con lo que observamos en el control de la comunidad microbiana ZymoBIOMICS representado en la Figura 14.

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS REGIONES HIPERVARIABLES

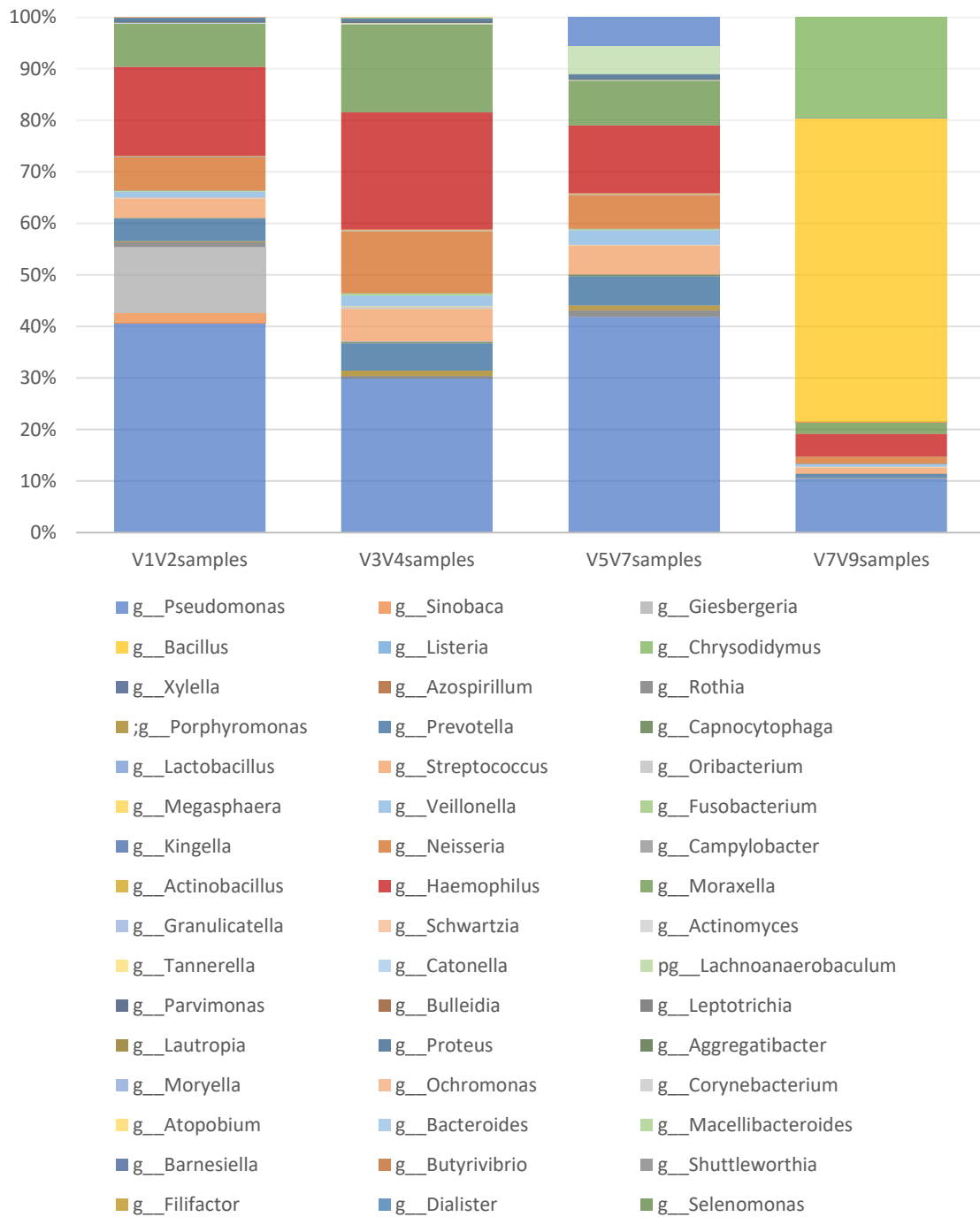


Figura 13. Variantes de secuencia de amplicón según las diferentes regiones hipervariables del gen 16S rRNA. Las muestras han sido agrupadas y promediadas por cada región hipervariable, y la composición taxonómica se muestra a nivel de género. Cada columna de la gráfica representa una región hipervariable, y cada color de la columna representa el porcentaje de la muestra total aportado por cada taxonomía.

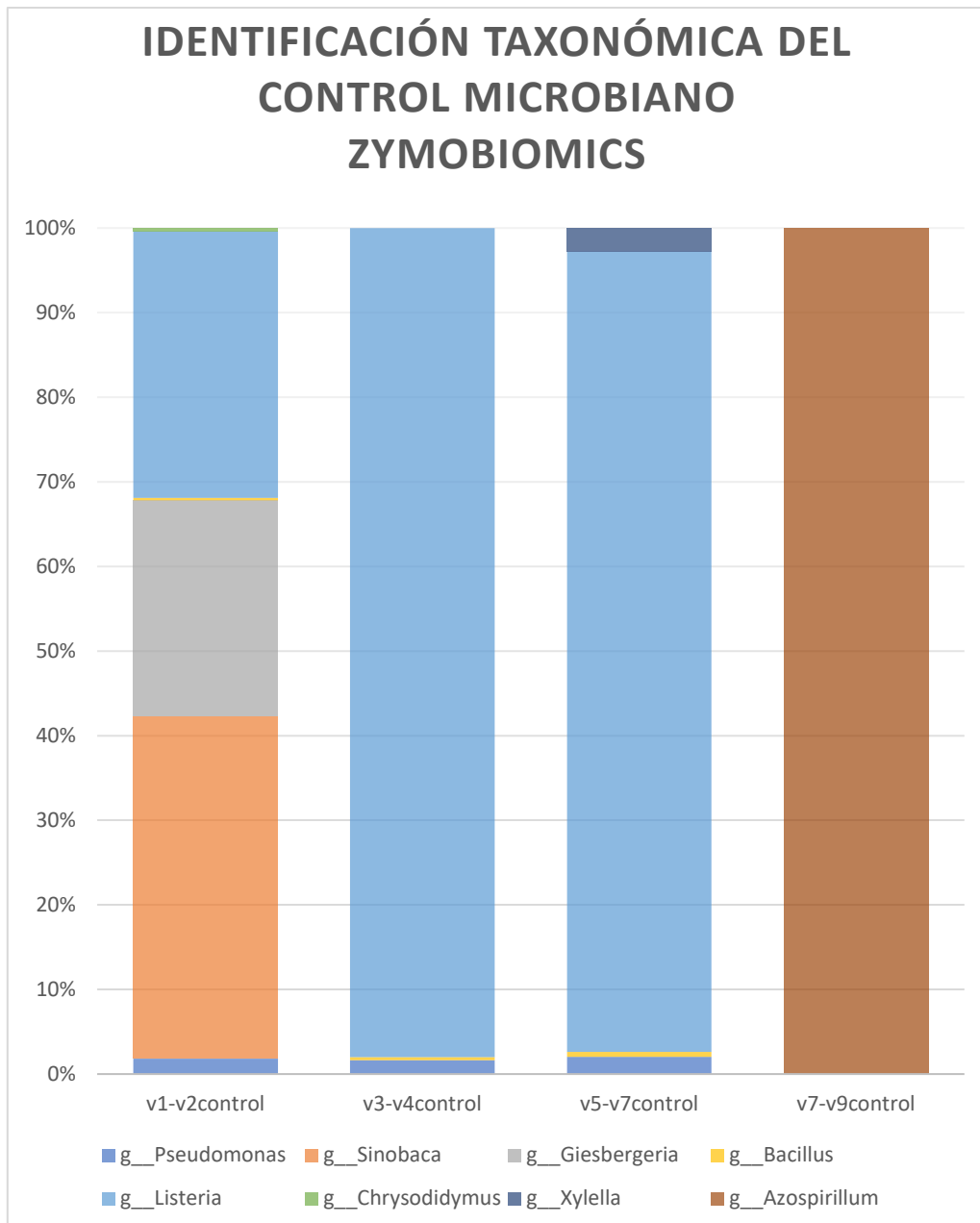


Figura 14. Variantes de secuencia de amplicón del control estándar de la comunidad microbiana según las diferentes regiones hipervariables del gen 16S. El control estándar de la comunidad microbiana de la zimobiómica se ha agrupado y promediado por cada región hipervariable, y la composición taxonómica se muestra a nivel de género. Se obtuvieron un total de 8 ASV con 93.915 recuentos de taxones en cada región hipervariable.

Se realizó una validación cruzada de la precisión del clasificador de microbiota como una curva característica operativa del receptor (ROC) para el control microbiano estándar (Zymbiomics) y comparaciones por pares con cada región hipervariable combinada (V1V2, V3V4, V5V7 y V7V9) para comparar la sensibilidad y especificidad entre cada

una de las regiones hipervariables y su curva ROC de control estándar microbiano específico entre ellas. Se observó el área significativa bajo la curva (AUC [IQR] = 0,736 [0,566-0,906]) para V1V2 (Figura 15). Estos resultados sugieren que para la microbiota respiratoria, la región hipervariable V1V2 presenta la mayor sensibilidad y especificidad como se muestra en la Figura 12.

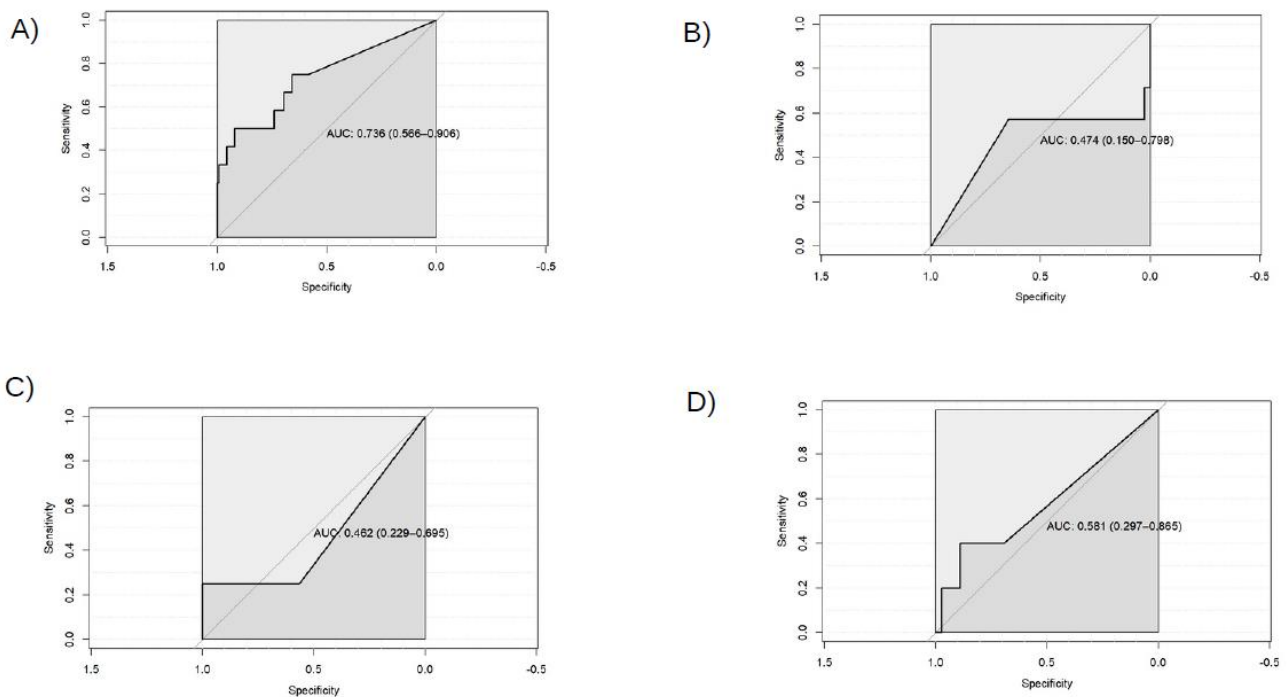


Figura 15. Curvas ROC para la región hipervariable validadas con control estándar microbiano comunitario simulado. La precisión de la validación cruzada del clasificador de microbiota se representa mediante la curva característica operativa del receptor (ROC) para los géneros bacterianos obtenidos, siendo A) el área bajo la curva (AUC) para V1V2 de 0,736 (0,566-0,906) el grafico muestra que AUC para V1V2 es la única estadísticamente significativa, B) AUC para V3V4 fue 0,474 (0,150-0,798), C) AUC para V5V7 fue 0,462 (0,229-0,695) y D) AUC para V7V9 fue 0,581 (0,297-0,865). Como se muestra en esta figura, hubo una fuerte asociación entre una composición de género de microbioma específica y la región hipervariable V1V2.

Diversidad alfa entre las regiones hipervariables combinadas de *16S rRNA*

Los índices de Shannon y Simpson inverso fueron significativamente más altos para V1V2, V3V4 y V5V7 en comparación con V7V9. La Figura 16 muestra las medidas de diversidad alfa para las diferentes regiones hipervariables con una prueba de Kruskal Wallis para observar diferencias significativas entre grupos. La diversidad alfa fue menor en el grupo V7V9 en términos de todas las métricas comparadas. El índice de Simpson se considera más como un índice de dominancia, ya que representa la proporción de especies en una muestra.

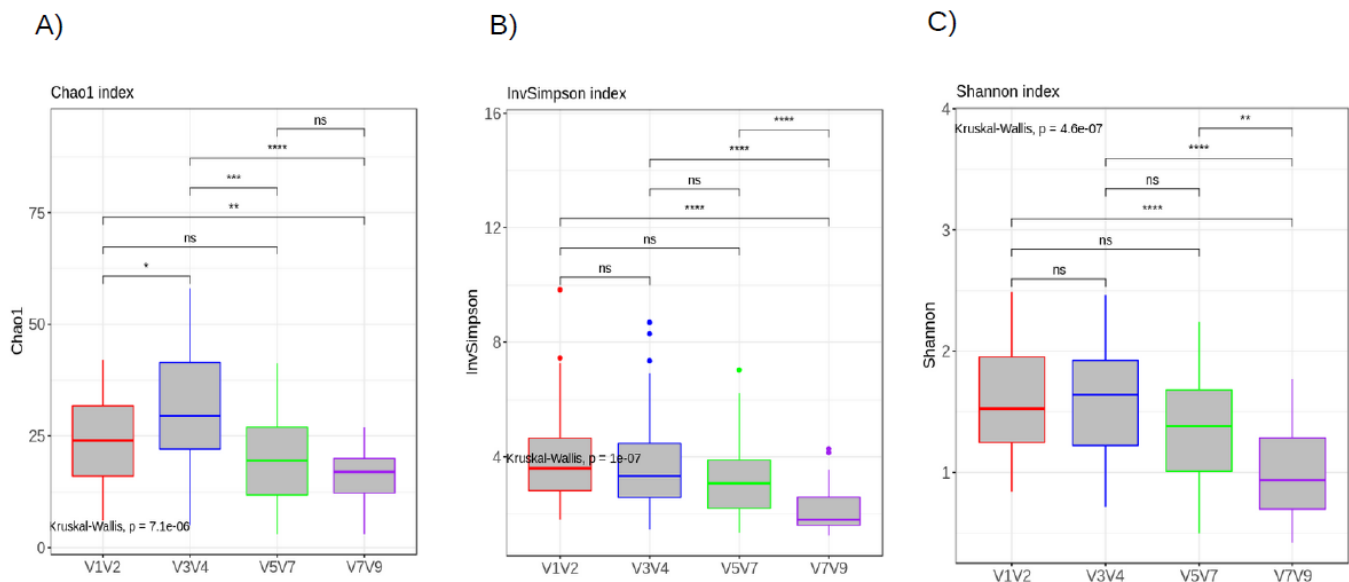


Figura 16. Diversidad alfa en muestras de esputo en comparación con diferentes regiones hipervariables combinadas de *16S rRNA*. La diversidad alfa, medida por los índices de diversidad de A) Chao1, B) Simpson inverso, y C) Shannon, se representa gráficamente para las diferentes regiones hipervariables V1V2, V3V4, V5V7 y V7V9 (rojo, azul, verde y púrpura, respectivamente). La línea dentro del diagrama de caja representa la mediana. Los valores más bajos y altos dentro del rango intercuartílico de 1,5 están representados por los bigotes. Todos estos índices de diversidad se redujeron significativamente en V7V9 (A) $p_{\text{Chao1}}=7.1 \times 10^{-6}$, (B) $p_{\text{invSimpson}}=1 \times 10^{-7}$ Y (C) $p_{\text{Shannon}}=4.6 \times 10^{-7}$.

En la Figura 16, V7V9 mostró una proporción significativamente menor de especies ($p < 0.0001$) en comparación con las demás. El índice de Shannon-Weiner se basa en la aleatoriedad presente en un sitio y considera tanto la riqueza de especies como la equidad en la distribución en una muestra. El índice de Shannon mostró la entropía más baja en V7V9 ($p < 0,0001$). Los índices de Chao1 revelan la riqueza de las comunidades bacterianas, en la Figura 4 se encuentra un Chao1 significativamente más bajo en V7V9 ($p < 0,0001$) mientras que el Chao1 más alto se encuentra en V3V4.

Diversidad beta entre las regiones hipervariables combinadas de *16S rRNA*

Los resultados se muestran en la Figura 17 como una ordenación de escala multidimensional no métrica (NMDS) de las diferencias de Bray-Curtis entre diferentes sitios ($R^2 = 0,44$, $p_{\text{Adonis}} < 0,001$). en el eje NMDS “0” y “1” indican las mínimas y máximas diferencias entre sitios, respectivamente. El test multivariante de ADONIS indican que hay una diferencia en las distancias V1V2 y V3V4 las que tiene menos diferencias, como se muestra en la Tabla 3.

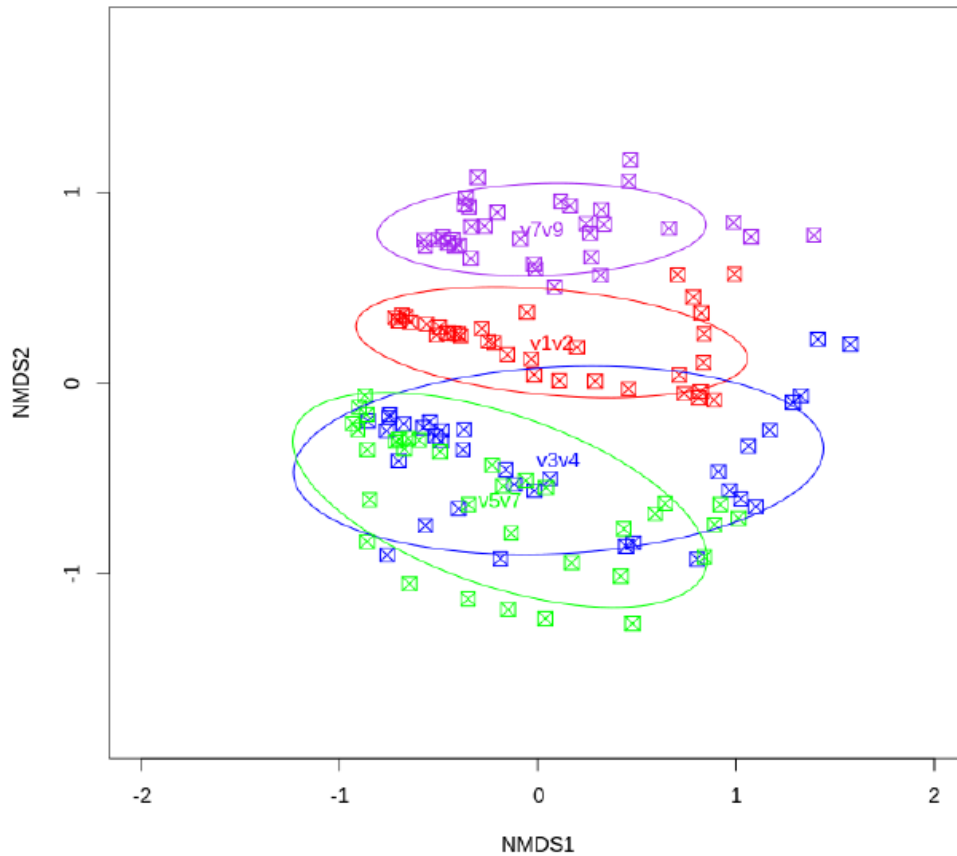


Figura 17. Ordenación del escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) del índice de disimilitudes de Bray-Curtis para las diferentes regiones hipervariables combinadas del 16S rRNA. Cada muestra está representada por un punto: el verde representa la taxonomía identificada en muestras de esputo con V5V7, el azul representa la identificada con V3V4, el rojo indica la identificada con V1V2 y el violeta representa la identificada con V7V9. Las muestras que son más similares entre sí se colocan más juntas. Los grupos identificados por las diferentes regiones combinadas parecen presentar diferencias composicionales.

Tabla 3. ANOVA de regresión lineal. Se utilizaron distancias de Bray-Curtis. Diferencia significativa entre las combinaciones: $R = 0,44$ y $p < 0,001$.

	Df	SumsOfSqs	Mean	F.Model	R2	Pr(>F)
HV	3	7.3949	2.46496	33.982	0.43577	0,001
Residuals	132	9.5748	0.07254		0.56423	
Total	135	16.9697			1.00000	

En particular, las regiones V3V4 y V5V7 se superpusieron en las dimensiones NMDS1 (eje X) y NMDS2 (eje Y) (Figura 17), lo que indica similitud en la composición. En contraste, V7V9 (puntos morados) y V1V2 (puntos rojos) presentaron altas disimilitudes entre ellos y también entre V3V4 y V5V7, indicando diferencias composicionales en la segunda dimensión (NMDS2). Gráfico de tensión de Shepard que muestra la relación entre las diferencias reales entre objetos (de la matriz de diferencias original) y las distancias de ordenación (es decir, las distancias en el gráfico final). Si estos están bien correlacionados, el estrés de ordenación será bajo y la visualización confiable. La tensión residual se representa en la Figura 18.

Relacionado con la evaluación del estrés de ordenación, un gráfico de pantalla que muestra la disminución del estrés de ordenación con un aumento en el número de dimensiones de ordenación permitidas. El gráfico de estrés de ordenación de NMDS2 permite encontrar el "punto de interrupción" puede indicar la selección de un número mínimo de dimensiones. Si no hay un punto de interrupción y se agregan más dimensiones conduce a una pequeña disminución lineal de la tensión, es posible que el conjunto de datos no sea adecuado para la ordenación de dimensiones bajas. La correlación no métrica fue de 0.941 por lo que las correlaciones entre las distancias de ordenación y las disimilitudes observadas resultó confiable.

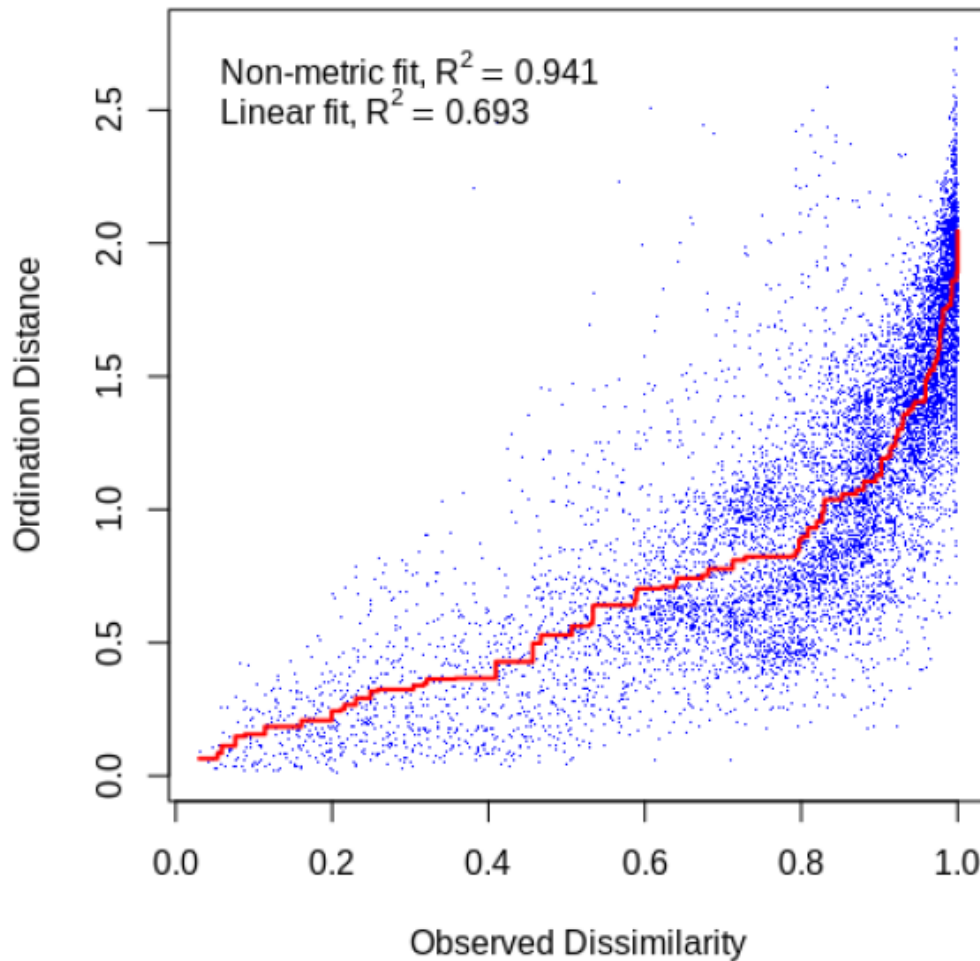


Figura 18. Gráfico de estrés de la ordenación de NMDS2 para la diversidad beta usando la disimilitud de Bray Curtis como una medida estadística utilizada para cuantificar la disimilitud de composición entre dos muestras o grupos. Gráfico de tensión de Shepard que muestra la relación entre las diferencias reales entre objetos y las distancias de ordenación (es decir, las distancias en el gráfico final). Si estos están bien correlacionados, el estrés de ordenación será bajo y la visualización confiable.

Puntuación del tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) para análisis de abundancia taxonómica

LEfSe (Análisis discriminante lineal Tamaño del efecto) determina las características (en este estudio: abundancia taxonómica a nivel de género) con mayor probabilidad de explicar las diferencias entre regiones hipervariables al combinar pruebas estándar de significación estadística con pruebas adicionales que codifican la consistencia biológica y la relevancia del efecto.

Actualmente, LEfSe se utiliza como una herramienta de descubrimiento de biomarcadores para datos de alta dimensión. Los resultados de este método mostraron diferencias en el poder discriminativo de cada región hipervariable. Por ejemplo, V1V2 discriminaba las abundancias relativas de *Pseudomonas*, *Glesbergeria*, *Sinobaca* y *Ochromonas*. V3V4 fue discriminante para *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Filifactor*, *Shuttleworthia*, *Lachnoanaerobium*, *Megasphaera*, *Leptothricia*, *Ekenella*, *Atropobium*, *Mecelli Bacteroides*, *Actinobacilus*, *Selomonas*, *Dialister* y *Cantonella*. V5V7 fue discriminante para *Psychrobacter*, *Avibacterium*, *Othia*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter*, *Granulicatella*, *Actinomyces* y *Parvimonas*. Finalmente, la región V7V9 fue discriminante para *Thiomonas*, *Lonepinella*, *Gemella*, *Enterobacter* y *Polysphondilium* (Figuras 19 y 207).

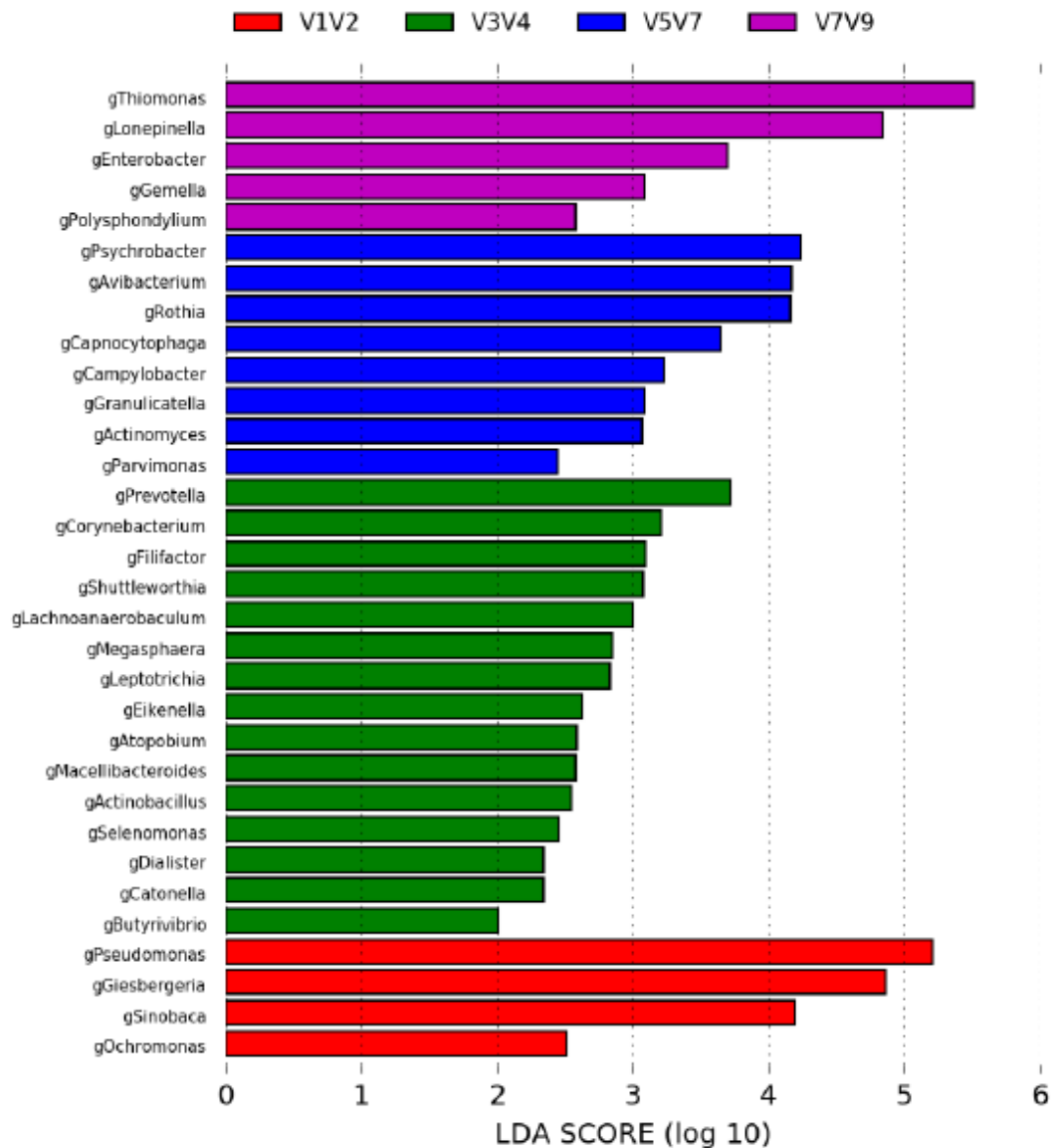


Figura 19. Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) para regiones combinadas diferencialmente abundantes entre las muestras de esputo. LDA encuentra taxones que son significativamente más abundantes en cada grupo. Las barras rojas representan los grupos bacterianos más abundantes identificados con V1V2, las barras verdes representan los identificados con V3V4, las barras azules representan los identificados con V5V7 y las barras moradas representan los identificados con V7V9 en muestras de esputo de pacientes con bronquiectasias. El tamaño de la barra representa el tamaño del efecto de la abundancia diferencial de taxones para las diferentes regiones.

Los resultados obtenidos por LEfSe se representaron mediante una cladograma en la Figura 20. El cladograma revela los géneros obtenidos para cada región hipervariable respecto a un árbol filogenético que engloba todos los géneros conocidos de bacterias.

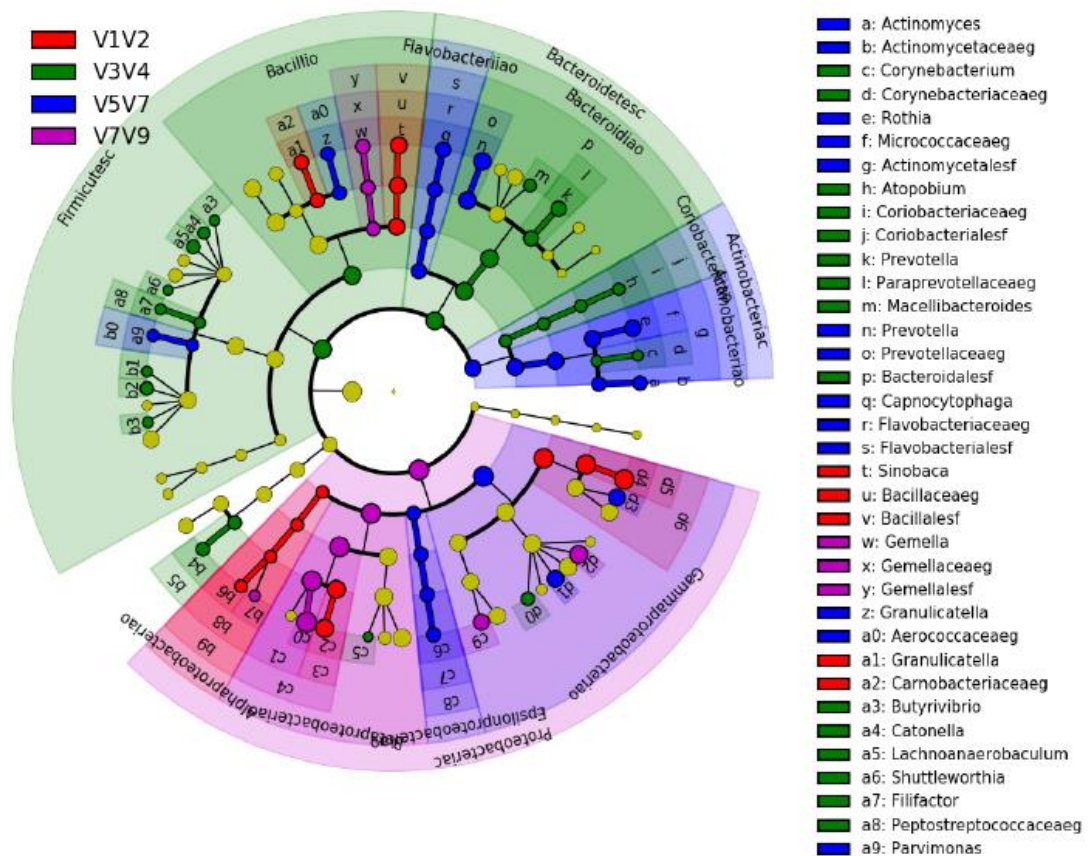


Figura 20. Cladograma de los resultados LEfSe de las diferentes regiones combinadas de 16S rRNA. Éste muestra las especies microbianas con diferencias significativas en la puntuación LDA entre los grupos analizados. Rojo, verde, azul y morado indican los grupos identificados por las diferentes regiones combinadas, con la clasificación de especies a nivel de clase, orden, familia y género mostrada de adentro hacia afuera. Los nodos rojo, verde, azul y morado en el árbol filogenético representan especies microbianas que confirman las diferencias en la clasificación taxonómica de las diferentes regiones combinadas. Los nodos amarillos representan especies sin diferencias significativas. Implica la visualización de cladogramas que se superpusieron entre regiones hipervariables

5.2 Resultados Estudio 2. La identificación del patobioma agrupado por carga de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con bronquiectasias

Tras un riguroso control de calidad y preprocesado, se obtuvieron más de 100.000 secuencias por muestra. Las ASVs se obtuvieron a través de la plataforma de análisis de datos del software Qiime2, a partir de la cual se identificaron las taxonomías microbianas,

obteniendo la puntuación de diversidad alfa, beta y LDA. Se realizaron análisis de microbioma agrupando mediante carga bacteriana mayor y menor de 5 LogCFU/ml y mediante la carga bacteriana mayor o menor de 4 LogCFU/ml.

La alta carga de PA se asocia con una disminución de la diversidad alfa

La diversidad alfa, que relaciona la riqueza y la uniformidad de ASVs, se cuantificó mediante el índice de especies observadas, el índice Chao1, los índices de diversidad de Shannon y Simpson inverso y el índice de Fisher. La figura 21 muestra las mediciones de diversidad alfa para una muestra de baja carga de PA frente a una de alta carga de PA. Si bien se observó que la diversidad alfa era menor en el grupo de alta carga en términos de todas las métricas comparadas, la diferencia fue significativa para la diversidad de Shannon ($p = 0,039$) y el índice de Simpson inverso ($p = 0,034$). En contraste con los hallazgos en el análisis de PA mayor o menor de 5 LogCFU/ml, en el punto de corte de carga bacteriana mayor o menor de 4LogCFU/ml, la PA>4LogCFU/ml no se asoció a una disminución de la diversidad alfa como muestra la figura 22.

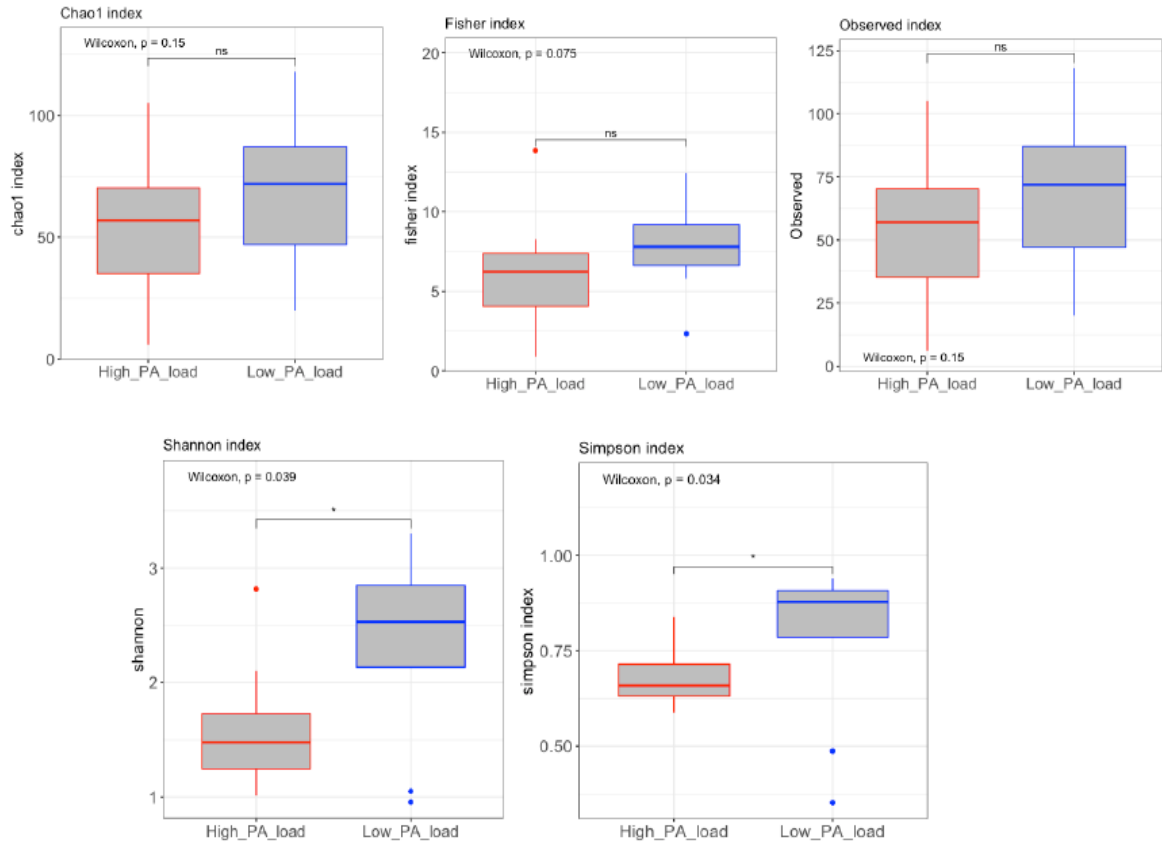


Figura 21. Diversidad alfa de muestras de esputo de pacientes con bronquiectasia agrupadas por carga bacteriana de *Pseudomona aeruginosa* (>5 LogCFU/ml; High_PA-Load y >5LogCFU/ml; Low_PA_Load). La línea dentro del diagrama de caja representa la mediana. Los valores más bajos y altos dentro del rango intercuartil 1,5 están representados por los bigotes. Los puntos muestran los valores atípicos y los valores de muestra individuales. Las pruebas estadísticas no mostraron diferencias para los índices observados, Chao1 y Fisher ($p_{\text{Observado}} = 0,15$, $p_{\text{Chao1}} = 0,15$, $p_{\text{Fisher}} = 0,075$), mientras que la diversidad de Shannon y Simpson disminuyó significativamente en las muestras de alta carga de PA en comparación con las de baja carga de PA ($p_{\text{Shannon}} = 0,039$, $p_{\text{Simpson}} = 0,034$).

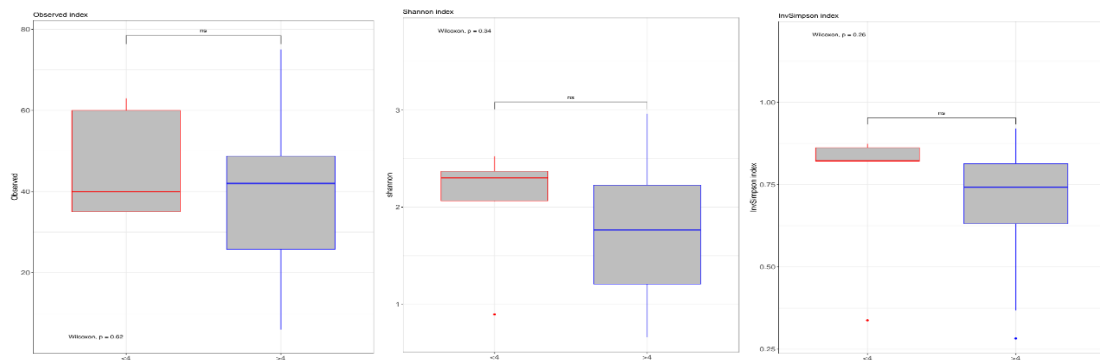


Figura 22. Diversidad alfa de muestras de esputo de pacientes con bronquiectasia agrupadas por carga bacteriana de *Pseudomona aeruginosa* (>4 LogCFU/ml y >4LogCFU/ml). No se observan diferencias significativas en el test de Wilcoxon entre las diversidades alfa de los dos grupos ($p_{\text{Shannon}} = 0,34$, $p_{\text{Simpson}} = 0,26$ y $p_{\text{Observed}} = 0,62$).

La alta carga de PA se asocia con una disminución de la diversidad beta

Las diferencias en la composición de la comunidad entre cargas bajas y altas de PA en el esputo de pacientes con bronquiectasias se midieron utilizando el índice de Bray-Curtis, que tiene en cuenta la presencia/ausencia de especies, así como su abundancia. Los resultados se muestran en la Figura 23 como análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS). Los pacientes con alta carga de PA (puntos rojos) mostraron un desplazamiento hacia la izquierda, lo que indica diferencias en la composición. En contraste la agrupación de Pa con punto de corte de 4 LogCFU/ml no presenta diferencias como se observa en la figura 24.

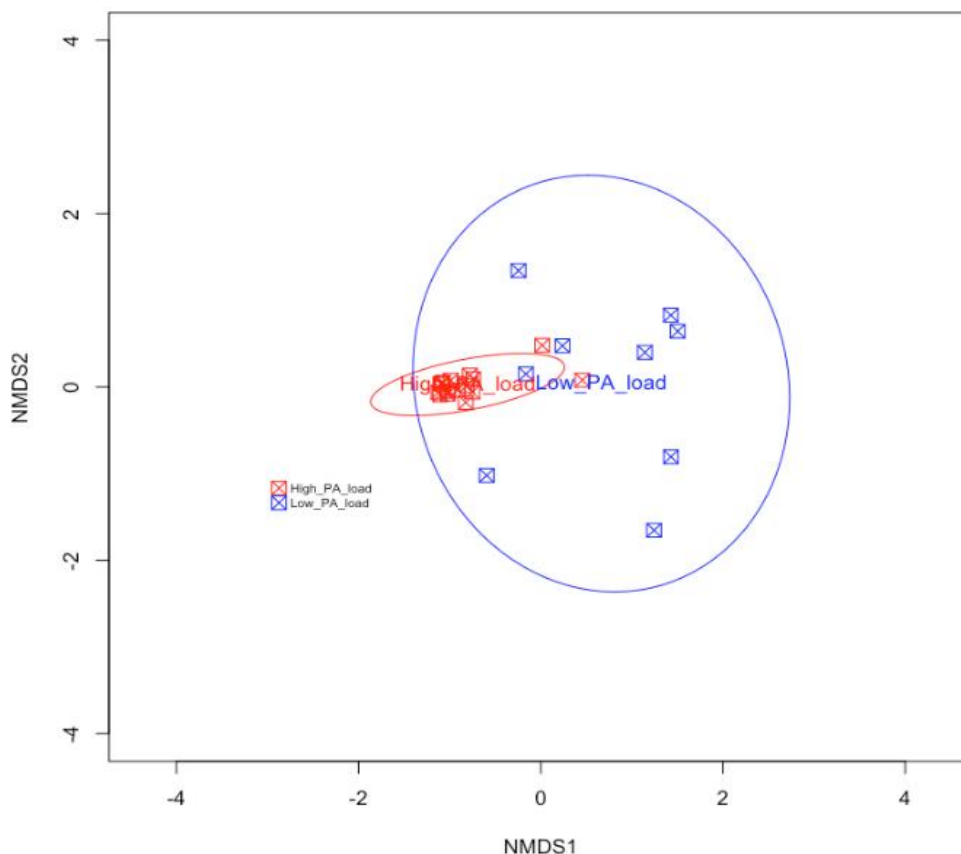


Figura 23. Análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS) basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis entre muestras con alta y baja carga de PA. Cada muestra está representada por un punto: el azul representa el esputo con baja carga de PA y el rojo representa la alta carga de PA. Las muestras que son más similares entre sí se ordenan más juntas: los dos grupos parecen presentar diferencias composicionales.

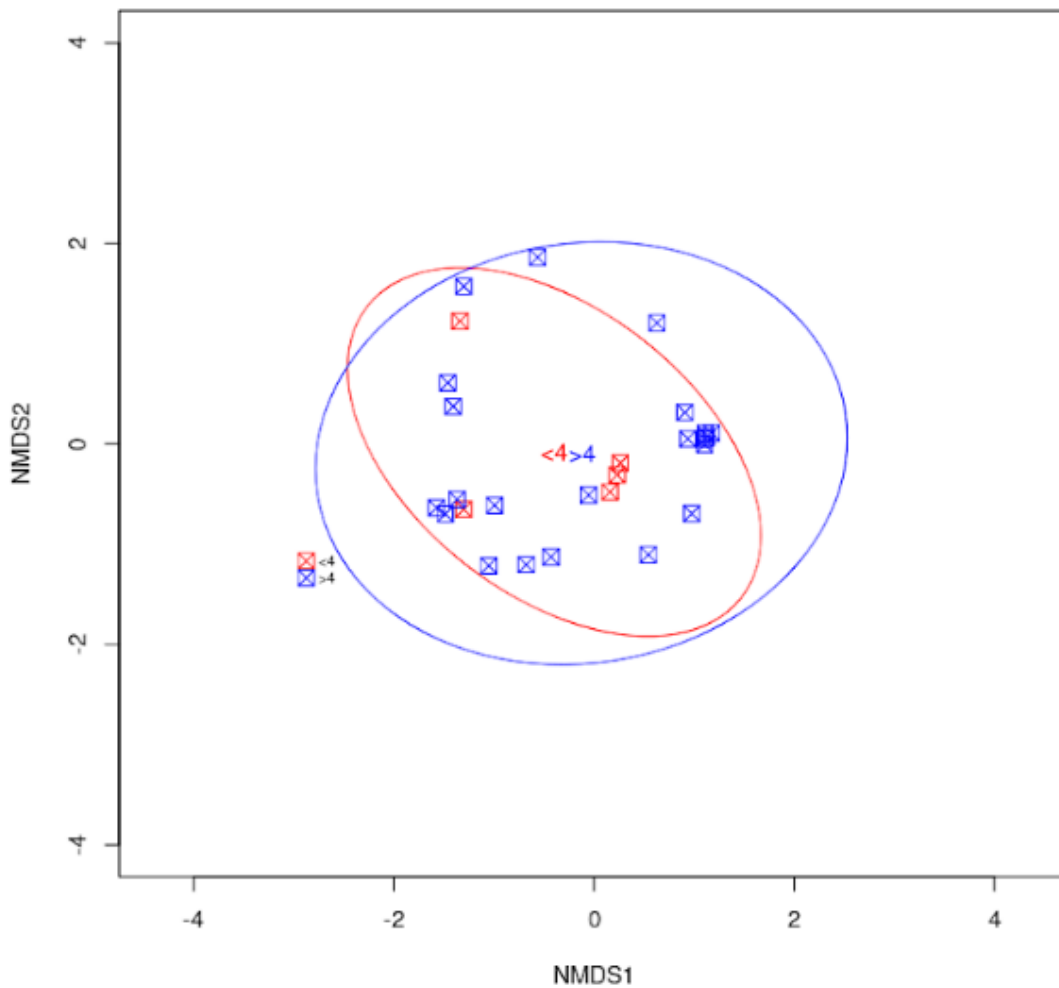


Figura 24. Análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS) basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis entre muestras con alta y baja carga de PA. Los dos grupos (>4 LogCFU/ml PA y < 4 LogCFU/ml PA), no presentan diferencias composicionales entre ellos.

En la agrupación con punto de corte 5LogCFU/ml, la prueba de composición de similitud de Adonis confirmó las diferencias ($R^2 = 0,32$, $p_{\text{Adonis}} = 0,001$), mostrando que el 32% de la variación en las distancias se explica por la diferencia en la carga de PA representada en la Tabla 4.

Tabla 4. Prueba de Adonis de regresión lineal basada en la distancia de Bray-Curtis agrupada por carga de PA 5LogCFU/ml. Se observó con la prueba ADONIS ($R^2=0,32$ y $p_{\text{Adonis}} < 0,001$).

Adonis test	DF	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Paload	2	2.9563	1.47814	7,313	0.32775	0,001
Residuals	30	6038	0.20213		0.37225	
Total	32	9.0200			1.00000	

Patrones microbianos y análisis de abundancia para la puntuación LDA

El análisis LEfSe se realizó a nivel de resolución de especies para determinar las diferencias cualitativas en la composición bacteriana entre los grupos de carga alta y baja de PA (respectivamente >5 y <5 CFU) de pacientes con BQ (Figura 25). Las muestras de esputo con alta carga de PA mostraron dominancia del género *Proteobacteria*, con una marcada abundancia de *Pseudomona* a nivel de género. Por el contrario, las comunidades bacterianas con menor abundancia de PA fueron muy diferentes entre las muestras: los principales biomarcadores encontrados incluyeron los géneros *Actinobacteria* (*Actinomyces*), *Bacteroidetes* (*Prevotella*) y *Firmicutes* (*Streptococcus*, *Veillonella*) con menor abundancia de *Proteobacteria* (*Campylobacter*).

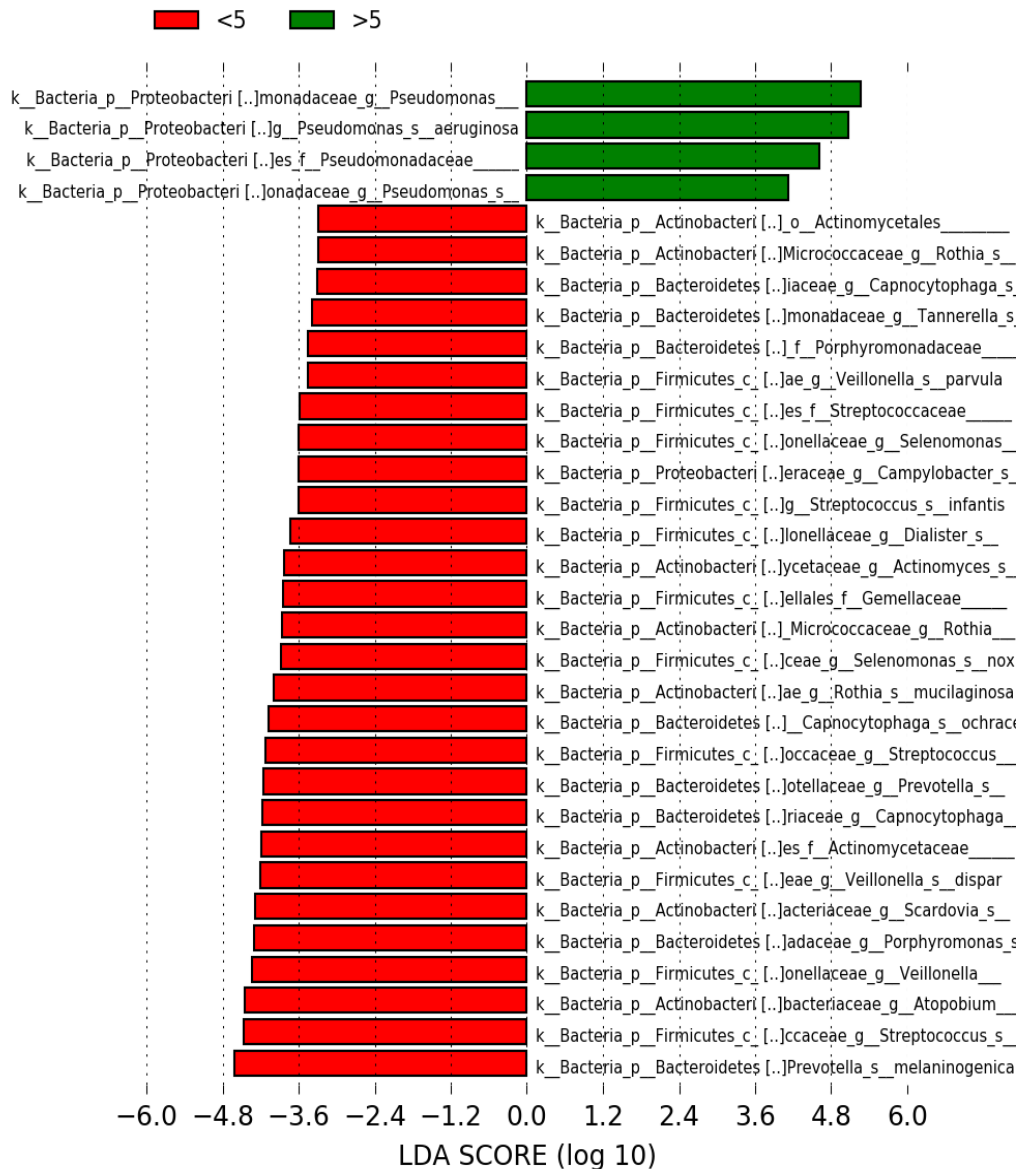


Figura 25. Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LefSE) para la carga de PA diferencialmente abundante (>5 y <5 CFU) entre las muestras de esputo. Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LefSE) para la carga de PA diferencialmente abundante (>5 y <5 CFU) entre las muestras de esputo. El LDA encuentra taxones que son significativamente más abundantes en un grupo. Las puntuaciones LDA negativas (barras rojas) representan los grupos bacterianos más abundantes en las muestras con baja carga de PA, mientras que las positivas (barras verdes) representan las de las muestras con alta carga bacteriana. El tamaño de la barra representa el tamaño del efecto de los taxones en el grupo particular.

5.3 Resultados Estudio 3: El patobioma en el fenotipo Mucoide de *Pseudomonas aeruginosa*.

Diversidad alfa: el fenotipo mucoide se asocia con una diversidad alfa disminuida

La diversidad alfa, que relaciona la riqueza y la uniformidad se cuantificó mediante el índice de especies observadas, el índice Chao1, los índices de diversidad de Shannon y Simpson y el índice de Fisher. La figura 26 muestra los índices de diversidad alfa relacionados con el fenotipo agrupados en mucoide o no mucoide en los que el índice de Shannon ($p=0,045$) y el índice de Simpson ($p=0,024$) fueron significativos.

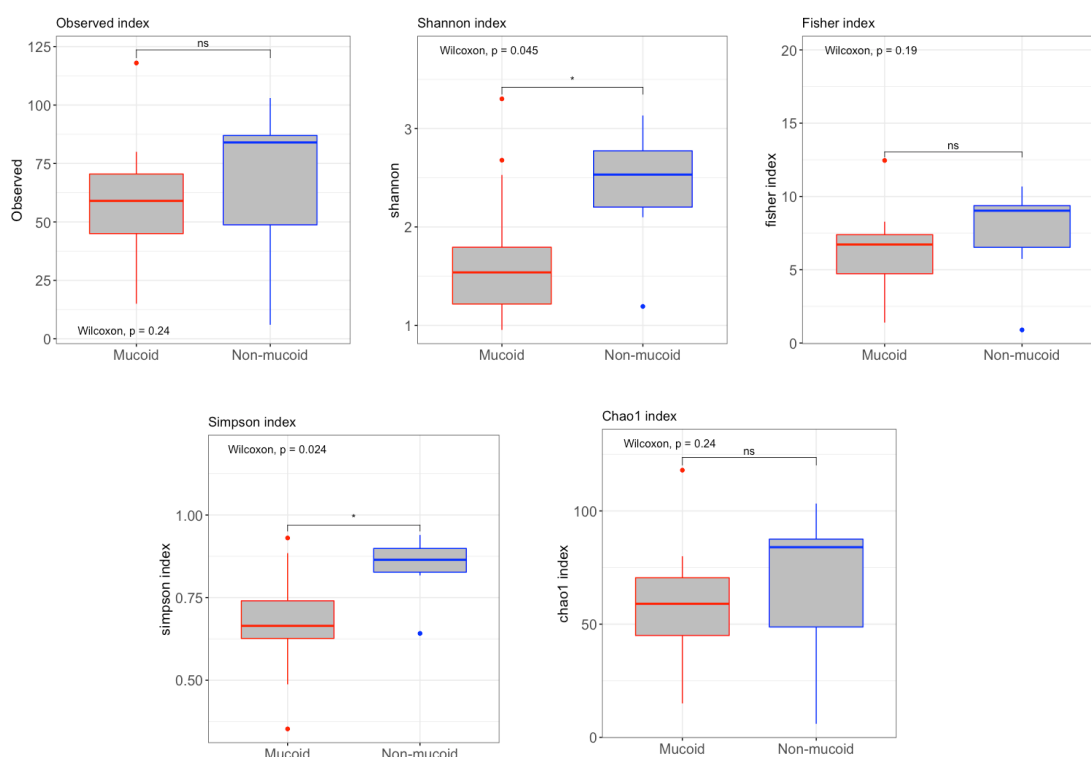


Figura 26. Diversidad alfa en microbioma BQ relacionada con fenotipo mucoide o no mucoide. La diversidad alfa, medida por Chao1, el índice de diversidad de Fisher y Shannon y Simpson se representa para pacientes con fenotipo mucoide alto (rojo) y fenotipo no mucoide (azul). La línea dentro del diagrama de caja representa la mediana. Los valores más bajos y más altos dentro del rango intercuartílico de 1,5 están representados por los bigotes. Los puntos muestran los valores atípicos y los valores de muestra individuales. Las pruebas estadísticas no mostraron diferencias para los índices observado, Chao1 y Fisher ($p_{\text{Observado}} = 0,24$, $p_{\text{Chao1}} = 0,24$, $p_{\text{Fisher}} = 0,19$). Se observaron valores significativamente estadísticos

mediante el test de kruskal wallis en los índices de Shannon y Simpson ($p_{\text{Shannon}}=0,045$ y $p_{\text{Simpson}}=0,024$).

Diversidad beta: el fenotipo mucoide se asocia con una diversidad beta disminuida

Las diferencias en la composición de la comunidad entre fenotipos mucoides y no mucoides en el esputo de pacientes con bronquiectasias se midieron utilizando el índice de Bray-Curtis, que tiene en cuenta la presencia/ausencia de especies, así como su abundancia.

Los result:

al no métrico

(NMDS).

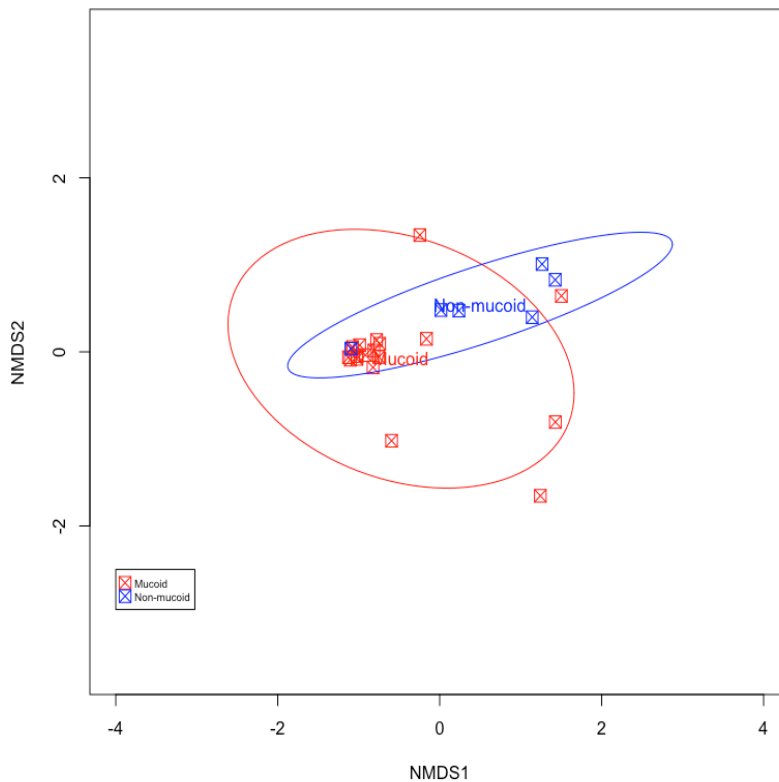


Figura 27. Análisis de escalado multidimensional no métrico (NMDS) basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis entre muestras con fenotipo mucoide y no mucoide. Cada muestra está representada por un punto: el azul representa el fenotipo no mucoide que se encuentra en el esputo y el rojo representa el fenotipo mucoide. Las muestras que son más similares entre sí se ordenan más juntas: los dos grupos parecen presentar diferencias de composición.

Los pacientes con fenotipo mucoide mostraron un desplazamiento hacia la izquierda, lo que indica diferencias en la composición entre muestras. La prueba de composición de

similitud de Adonis confirmó las diferencias en el fenotipo ($R^2 = 0,21$ $p_{\text{Adonis}} = 0,001$), mostrando que el 21 % de la variación en las distancias se explica por la distancia en los grupos de fenotipos como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados del test de Adonis en base a la distancia de Bray-Curtis. El fenotipo PA muestra una proporción significativa de la variación en la composición de la comunidad, que se observó con la prueba ADONIS ($p_{\text{Adonis}} = 0,001$).

Adonis test	DF	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Phenotype	2	1,9427	0,97136	4,1175	0.21538	0,001
Residuals	30	7,0773	0.23591		0.78462	
Total	32	9.0200			1.00000	

Patrones microbianos y análisis de abundancia para la puntuación LDA

Se realizó un análisis LEfSe para determinar el agrupamiento de la composición del patobioma por Fenotipo PA (mucoide y no mucoide). Las muestras de esputo con PA mucoide mostraron dominancia de los géneros Proteobacteria, con una marcada abundancia de Pseudomona y Neisseria a nivel de género, mientras que los patrones microbianos en el grupo no mucoide incluyeron los géneros Actinobacteria (*Actinomyces* y *Rothia*), Bacteroidetes (*Prevotella*) y Firmicutes (*Streptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Granulicatella*) (Figura 28).

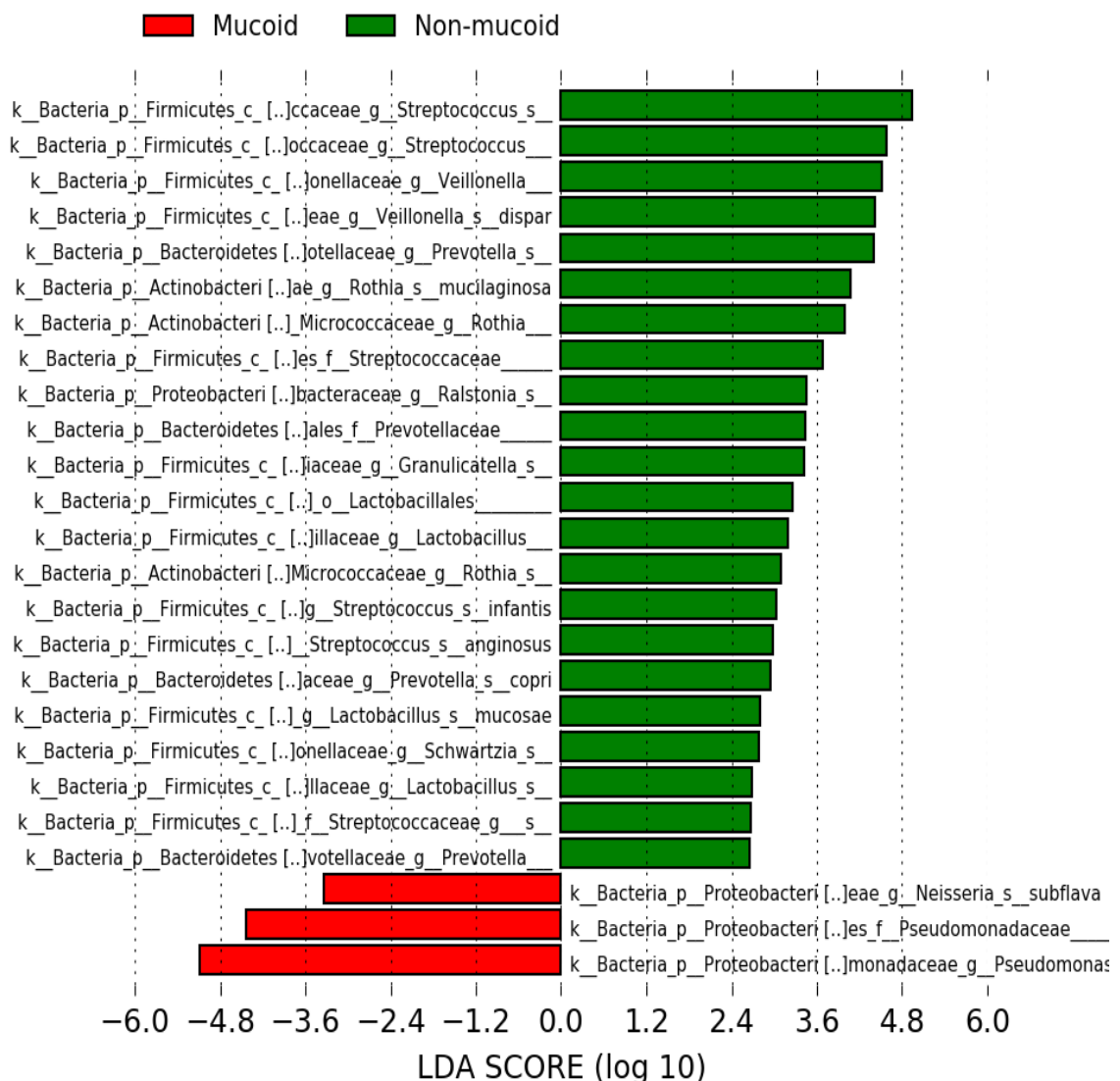


Figura 28. Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LefSE) para fenotipo diferencialmente abundante (Mucoide y No mucoide). El LDA encuentra taxones que son significativamente más abundantes en un grupo. Las puntuaciones LDA negativas (barras rojas) representan los grupos bacterianos más abundantes en las muestras de Mucoide, mientras que las positivas (barras verdes) representan las de Non-mucoide. El tamaño de la barra representa el tamaño del efecto de los taxones en los grupos fenotípicos.

Inferencias metabólicas según el 16S rRNA asociadas al fenotipo Mucoide y no mucoide

El método PICRUSt2 consiste en la colocación filogenética, la predicción del estado oculto y la tabulación de la abundancia de genes y rutas por muestra. PICRUSt2 es independiente de si las secuencias de entrada están dentro de una referencia o no, lo que

da como resultado que casi todas las variantes de secuencia de amplicón de entrada (ASV) se retengan en la salida final (output).

Las predicciones de abundancia de genes funcionales a partir de secuencias 16S rRNA fueron computadas con PRICRUST2, el resultado principal son tablas con las abundancias de los procesos metabólicos y sus enzimas. No se observaron correlaciones entre alguna ruta metabólica predominante y los fenotipos mucoide y no mucoide. Se interpretó que según el fenotipo de PA no existen rutas metabólicas específicas asociadas a dicho fenotipo.

Las rutas metabólicas identificadas mediante MetaCyc database que mostraron mayor actividad independientemente del fenotipo representadas en el mapa de calor “Heatmap” fueron: PWY-3781, FAO-PWY, PWY-7094 y PWY-7663. Estas rutas fueron observadas en 19 de las 34 muestras (55,88%) pese a que no fueron representativas de ninguno de los grupos por fenotipo.

A continuación se expone la descripción de las rutas metabólicas predominantes en las muestras agrupadas por fenotipo mucoide y no mucoide:

PWY-3781 representa el “Pathway: aerobic respiration I (cytochrome c)”

Varias moléculas de NAD se reducen a NADH en el ciclo glucolítico. Estas moléculas ricas en energía tienen un par de electrones con alto potencial de transferencia. La energía libre liberada durante la transferencia de esos electrones puede usarse para sintetizar ATP. La vía de respiración aeróbica que se muestra aquí es paralela al transporte de electrones resultante de la oxidación de NADH con la creación de un gradiente de protones y el potencial de membrana que lo acompaña, lo que lleva a la síntesis de ATP.

Los aceptores terminales conocidos incluyen compuestos orgánicos (fumarato, sulfóxido

de dimetilo o N-óxido de trimetilamina) o compuestos inorgánicos (nitrato, nitrito, óxido nitroso, clorato, perclorato, iones de manganeso oxidado, hierro férrico, oro, selenato, arsenato, sulfato y azufre).

(<https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-3781>)

FAO–PWY Pathway: fatty acid β -oxidation I (generic)

El catabolismo de los ácidos grasos procede a través de varias rutas, que dependen de la longitud de los ácidos, si el número de carbonos es par o impar, y si son saturados o insaturados. Esta vía representa el ciclo "central" de la β -oxidación, un mecanismo que elimina dos átomos de carbono con cada vuelta del ciclo.

Los ácidos grasos saturados que se enrutan a esta vía central se procesan hasta que solo quedan dos o tres carbonos. Cuando los ácidos grasos pares se descomponen, el producto final es el compuesto de dos carbonos acetil-CoA, que es un intermediario básico del metabolismo central y puede enrutarse al ciclo TCA para el catabolismo completo o al ciclo del glioxilato para utilizarse para la biosíntesis. Cuando se descomponen los ácidos grasos impares, el producto final de la vía es el compuesto de tres carbonos propanoil-CoA, que en *Escherichia coli* se carboxila a metilmalonil-CoA y se convierte en succinil-CoA. (<https://metacyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=FAO-PWY&ENZORG=TAX-9606>)

PWY–7094 Pathway: fatty acid salvage

La biosíntesis de ácidos grasos en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 es iniciada por la β -cetoacil-[acil-carrier-protein] sintasa FabY que cataliza la condensación de acetil-CoA con malonil-[acp], produciendo acetoacetil-[acp], que puede alargarse en ácidos grasos más largos a través del ciclo de elongación de ácidos grasos.

Los mutantes fabY son deficientes en la biosíntesis de ácidos grasos. Sin embargo, este fenotipo se puede suprimir mediante la suplementación de los medios de cultivo con ácidos grasos exógenos con longitudes de cadena de ocho o más carbonos. Tras el transporte a la célula, los ácidos grasos forman tioésteres de acil-CoA, que son catabolizados por el ciclo de oxidación β . Pese a no obtener resultados según el fenotipo en esta ruta metabólica se observa como la presencia de PA esta directamente relacionada en este proceso de biosíntesis de ácidos grasos. (<https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-7094&detail-level=2>)

PWY-7663 Pathway: gondoate biosynthesis (anaerobic)

En el caso de la producción de gondoato bacteriano (que involucra al oleato como intermediario), el paso clave en la ruta es una isomerización similar, pero de un intermediario posterior de la ruta de biosíntesis del palmitato, un (2E)-dodec-2-enoyl-[acp], que contiene una cadena de acilo más larga (tenga en cuenta que la reacción no se muestra en esta vía, sino en la biosíntesis de oleato IV (anaeróbica), que describe pasos anteriores en el proceso). La enzima que cataliza la reacción de isomerización en *Aerococcus viridans* es una hidratasa/isomerasa única, codificada por fabQ, que cumple las funciones tanto de fabZ (la hidratasa involucrada en el proceso de elongación de los ácidos grasos) como de fabA, que es esencial para la producción de ácidos grasos insaturados.

(<https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-7094&detail-level=2>)

De las 4 rutas metabólicas predominantes en el mapa de calor, las tres últimas están involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos por lo que PA podría tener un papel relevante en esta ruta como se muestra en las figuras 29 y 30.

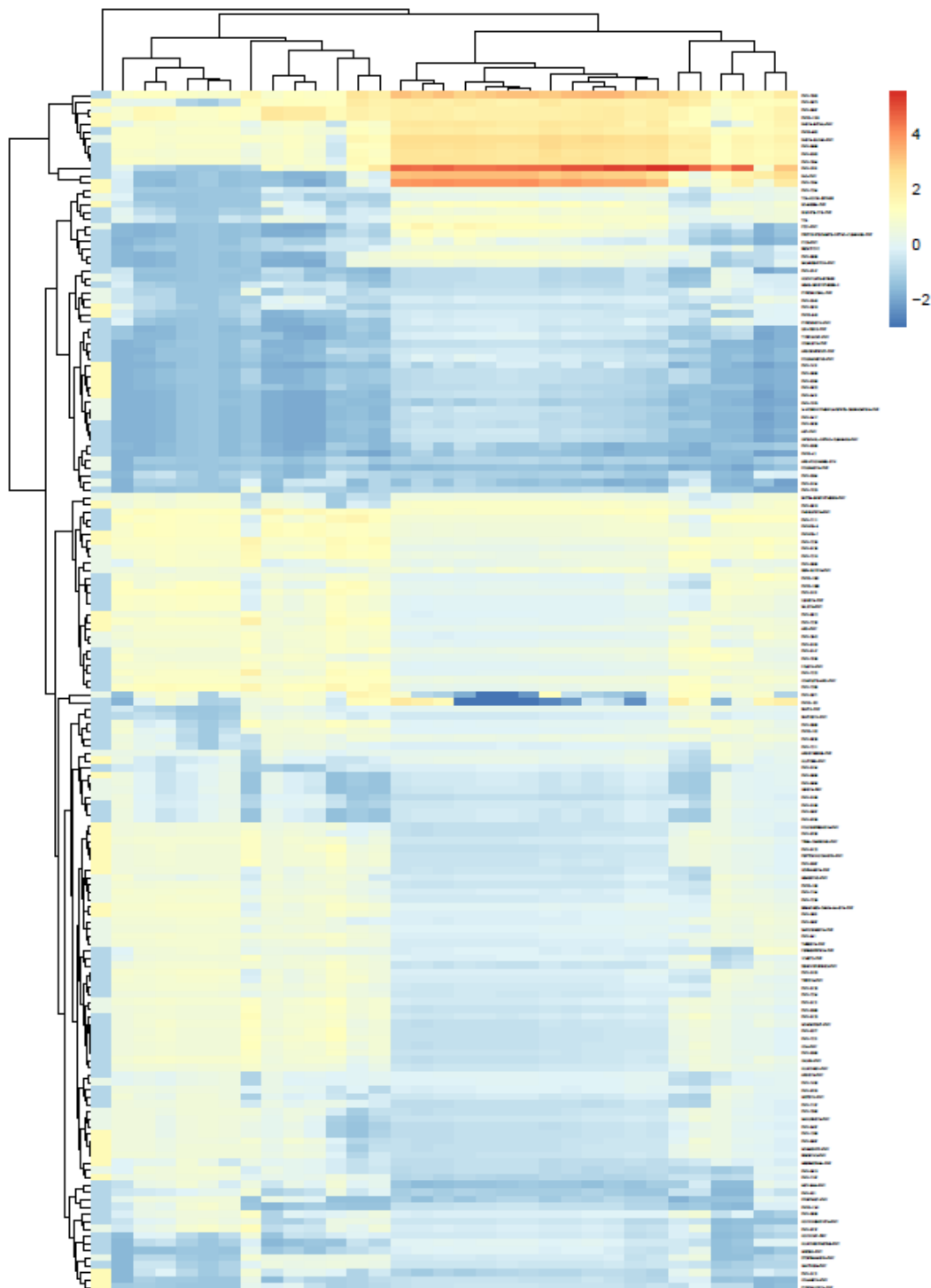


Figura 29. Inferencia metabólica mediante las taxonomías microbianas y sus frecuencias relativas con la herramienta Picrust2. El mapa de calor representa la abundancia diferencial de taxones microbianos que variaron entre los grupos mucoide y no mucoide. Las columnas representan los grupos por fenotipo de los taxones en nivel especie y las filas representan las rutas metabólicas. Las rutas metabólicas identificadas mediante MetaCyc database que mostraron mayor actividad independientemente del fenotipo representadas en el mapa de calor “Heatmap” fueron: PWY-3781, FAO-PWY, PWY-7094 y PWY-7663.

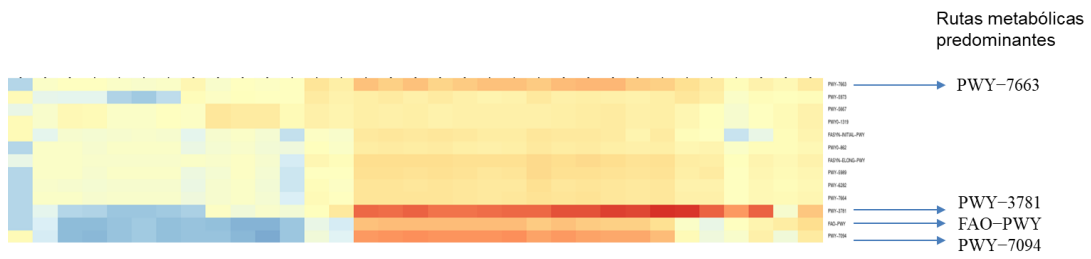


Figura 30. Ampliación de las rutas metabólicas predominantes PWY-3781, FAO-PWY, PWY-7094 y PWY-7663. En esta figura se representa una ampliación de la figura 27 debido a la dificultad de interpretar y leer las rutas predominantes.

6.DISCUSIÓN

6. DISCUSION

Los principales hallazgos de la presente tesis doctoral son: 1) La identificación microbiana del esputo basada en el gen *16S rRNA* es diferente en función de la región hipervariable de dicho gen utilizada. V1V2 es la región con mayor sensibilidad y especificidad para identificaciones taxonómicas en muestras de esputo. 2) Hemos determinado que $>5\text{LogCFU/mL}$ de PA se asocia a la presencia de un patobioma respiratorio. Este hallazgo tiene implicaciones diagnosticas dado que actualmente el punto que discrimina infección en muestras de esputo es de $>6\text{LogCFU/mL}$. 3) La presencia del fenotipo mucóide de PA, típico de las biopelículas, conlleva una menor diversidad y composición dominada por proteobacterias de género *Pseudomonas* lo cual hemos denominado patobioma mucóide. 4) El fenotipo mucóide no guarda asociación clara con rutas metabólicas diferenciadas por parte del huésped.

En el estudio de la identificación de las regiones hipervariables con mayor poder de resolución para la identificación taxonómica el principal hallazgo es que cada región hipervariable *16S rRNA* proporciona diferencias significativas en la identificación taxonómica. En particular, encontramos que V1V2 tenía el poder de resolución más alto en la identificación precisa de taxones bacterianos respiratorios de muestras de esputo. *Pseudomonas*, es el género dominante en nuestras muestras. Además, la mejor curva ROC fue para V1V2, lo que confirma su mayor sensibilidad y especificidad para los análisis de microbiomas de esputo. LEfse confirmó también la abundancia diferencial entre cada región hipervariable. Es importante destacar que V1V2, V3V4 y V5V7 presentaron diversidad alfa similar mientras que V1V2, V3V4 la disimilitud de composición más baja, lo cual significa que tenían una composición más similar.

Ningún estudio ha informado previamente el poder de resolución de las regiones hipervariables de *16S rRNA* para análisis del microbioma respiratorio. Sirichoat *et al.* (161) estudió la microbiota vaginal y encontró que el análisis de V3 seguido por el de las regiones V6V7 y V4 dio la mayor riqueza y diversidad, mientras que el análisis de V9 dio la menor riqueza y diversidad. A pesar de que el uso de regiones únicas logra una alta cobertura, también es cierto que tiene un poder discriminatorio más bajo dada la longitud corta de los pares de bases (pb) (17), así como también mejora la tasa de error acumulada (9). Los resultados de esta tesis están de acuerdo con los de Sirichoat *et al.* (161), ya que encontramos que V3V4 y V5V7 (que comprende V6) presentaron los valores más altos para los índices alfa, pero también encontramos resultados similares para V1V2 no incluidos por otros (161).

García-López *et al.* estudiaron 24 muestras del hepatopáncreas y los intestinos usando las bases de datos de referencia Greengenes y SILVA para agrupamiento y clasificación taxonómica. (156) Descubrieron que el análisis V3V4 resultó en la mayor riqueza, lo cual está de acuerdo con nuestro estudio. En general, los hallazgos de García-López *et al.* y nuestros resultados sugieren que el equilibrio entre cobertura de longitud y profundidad para identificar taxones requiere un tamaño de alrededor de 500 pb, combinando una de las regiones más conservadas con una de las regiones más variables como V4 y V3, respectivamente (156).

Yang *et al.* evaluaron la sensibilidad de diferentes regiones hipervariables de *16S rRNA* como biomarcadores de diferentes filos bacterianos utilizando el método de distancia geodésica y el método de agrupamiento jerárquico aglomerativo (AHC) de consenso (162). La combinación V4V6 representó la región hipervariable óptima para el estudio filogenético bacteriano de nuevos phyla (162). Sin embargo, su metodología y la

nuestra eran diferentes. Por lo tanto, se necesitan más estudios de metodología estandarizada para comparar V4V6 con las regiones V1V2 utilizadas para confirmar la identificación taxonómica(162)

La selección de las regiones hipervariables combinadas también depende del uso de protocolos publicados o diseñados internamente (162–164). Sperling *et al.* utilizaron el *kit* de secuenciación de alto rendimiento (perfil 16S) del gen Ion *16S rRNA* disponible comercialmente, basado en 6 amplicones que representan regiones 16S (V2, V3, V4, V6, V7, V8 y V9). Ese estudio mostró que los patrones de diversidad obtenidos de las encuestas del microbioma 16S dependían tanto del amplicón como del protocolo utilizado (165). Además, los datos de composición microbiana difieren según el método de aislamiento de ADN, la preparación de la biblioteca y las plataformas de secuenciación utilizadas (166). Existen *kits* comerciales para el análisis de perfiles *16S* que contienen cebadores de PCR, generalmente para las regiones V3 y V4 y protocolos de “shotgun” (166).

La mayoría de los otros estudios citados no son directamente comparables, ya que la riqueza o la entropía varían según la composición real, que depende del nicho. Este estudio es el primero en evaluar las regiones hipervariables en el esputo, por lo que se necesitan más estudios con dicha muestra biológica para ubicar nuestros hallazgos en un contexto más amplio.

Nuestra investigación tuvo varias limitaciones. Primero, nos enfocamos en regiones hipervariables combinadas y no usamos regiones individuales. Sin embargo, el uso de regiones únicas también tiene limitaciones importantes como se mencionó anteriormente. En segundo lugar, DADA2 identificó más variantes reales y secuencias de salida que otros métodos, a pesar de que Deblur se recomienda para fragmentos de pb más cortos

(por ejemplo, ~ 250 pb), por esta razón fue adecuado en nuestro análisis, recortamos a 250 pb. Sin embargo, debido a que utilizamos cebadores de fase para estos estudios, el uso de Deblur fue una opción adecuada para analizar múltiples ejecuciones de secuenciación. A pesar de que actualmente hay disponibles versiones más actualizadas de SILVA, las diferentes regiones fueron capacitadas con Greengenes. Sin embargo, el uso de SILVA o Greengenes no afecta las comparaciones entre las diferentes regiones hipervariables ya que el sesgo en la identificación taxonómica podría afectar por igual a cada región. Finalmente, otra limitación con el perfilado de *16S rRNA* es que el límite de longitud de la plataforma Illumina Miseq es de 300 pb, lo que enfatiza la importancia de identificar la mejor región hipervariable para la identificación taxonómica.

Nuestro estudio confirma que cada región hipervariable *16S rRNA* proporciona diferencias significativas en la identificación taxonómica. En particular, nuestros resultados sugieren que V1V2 en lugar de V3V4 exhibe un mayor poder de resolución para la identificación de taxonomía del esputo. Se recomienda realizar más investigaciones para dilucidar el poder de resolución de cada región hipervariable en comparación con la secuenciación de longitud completa del *16S rRNA*. Sin embargo, los protocolos como las plataformas de secuenciación Nanopore que involucran el *16S rRNA* de longitud completa deben estar más disponibles y mejorar las tasas de error. (167) Mientras tanto, V1V2 se puede utilizar para la identificación taxonómica en el esputo, ya que tiene el poder de resolución más alto entre las otras hipervariables.

En el segundo trabajo de esta tesis, se estudió la implicación de la carga bacteriana de PA en la microbiota, el punto de corte de carga bacteriana identificada como patobioma se identificó en 5 LogCFU. En estudios previos en cultivos bacterianos establecer hasta 6 LogCFU para definir infección lo cual genera la hipótesis de si ocurre antes la infección

o la disbiosis microbiana. Este hallazgo muestra que la infección está por debajo de 6 LogCFU porque en 5 LogCFU encontramos una pérdida de diversidad y el establecimiento del patobioma por PA. Tal vez el corte de cultivos bacterianos para definir la infección esté infradiagnosticado en comparación con la secuenciación de alto rendimiento del *16S rRNA*. Los estándares de oro solo muestran el patógeno en cultivos, mientras que el *16S rRNA* muestra diversidad y abundancia bacteriana en el entorno de los pulmones, por esta razón, dicho gen es una nueva herramienta para definir la infección y la densidad de patógenos en los pulmones.

Este es el primer estudio en bronquiectasias que relaciona cultivos recomendados con disbiosis microbiana. En cuanto a los puntos de corte de infección por PA, se observó una disbiosis y establecimiento del patobioma en CFU mayor que 5, mientras que la literatura sobre cultivos clásicos por carga bacteriana de PA define la infección en CFU mayor o igual a 6 (168). Aunque se considera infección para CFU mayor o igual a 6, existe una disbiosis en CFU mayor que 5, por lo que la disminución de la diversidad microbiana y la aparición del patobioma aparecen mucho antes del corte establecido como infección desde el punto de vista de la disbiosis microbiana. Esto plantea la cuestión de si el límite de infección está bien definido. Para ello, se requerirán más estudios en el futuro para ajustar la apariencia del patobioma y las disbiosis con las UFC consideradas infección en función de las manifestaciones clínicas de los pacientes.

En esta tesis, el objetivo principal fue observar la diversidad, composición y patrones microbianos en muestras de esputo extraídas de pacientes con bronquiectasias, agrupadas por carga de PA. Se encontró que la presencia de una alta carga de PA estaba asociada con una disminución significativa en la riqueza y abundancia de taxones, definidos por la diversidad alfa y beta. Además, el puntaje LDA reveló diferencias en la composición

bacteriana entre los dos grupos, con un patrón repetido de dominancia de especies de *Pseudomona* en aquellas muestras con una alta carga de PA, en comparación con el otro grupo donde las comunidades bacterianas presentaron más diferencias (126). Así, se encontró una relación significativa entre la diversidad alfa, beta y LEfSe, ya que se observó que la presencia de una alta carga de PA en el esputo estaba asociada con una disminución en la diversidad, abundancia y variabilidad de la flora concomitante. Por lo tanto, la agrupación de carga de PA puede representar un biomarcador microbiano potencial de disbiosis de baja diversidad y dominante del patobioma relacionado con la gravedad en pacientes con bronquiectasias.

De hecho, la presencia de $>5\text{LogCFU/mL}$ puede provocar cambios en el ecosistema pulmonar y la microbiota, creando un patobioma. Este concepto define la integración, relación y adaptación de un agente patógeno dentro de su microbioma, en respuesta a la presión selectiva creada por las fluctuaciones ambientales y las interacciones con la microbiota huésped y pulmonar. Además, el patobioma puede ser responsable de influir e impulsar procesos de enfermedad (20).

Este estudio no tuvo como objetivo investigar los cambios del patógeno dentro de su microbioma ni el efecto del tratamiento sobre él. Sin embargo, la terapia con antibióticos a largo plazo es uno de los pilares del tratamiento para el manejo de pacientes con bronquiectasias, y está bien establecido que los antibióticos de amplio espectro pueden alterar la microbiota residente y su entorno (123).

Otra limitación del estudio es el pequeño tamaño de la muestra (34 pacientes). Sin embargo, todos los esputos fueron de alta calidad según el Índice de Murray. Estudios previos han demostrado que los esputos de alta calidad se representan en las vías respiratorias inferiores. Se requieren análisis con más pacientes no sólo para replicar

nuestros hallazgos, sino también para investigar la existencia de posibles diferencias asociadas con las características individuales. De hecho, la microbiota es dinámica y puede verse influenciada por muchos factores externos, como el género, la edad, la etiología de la enfermedad, el uso de tratamientos crónicos y la presencia de enfermedades concomitantes, como se describió previamente en la EPOC (126).

Otra limitación de nuestro proyecto son los datos restringidos obtenidos durante la preparación del ADN, ya que solo se estudiaron las regiones hipervariables V3V4 del *16Sr RNA* bacteriano. De hecho, el uso de diferentes regiones hipervariables puede influir en la abundancia y taxonomía obtenida en la muestra y, por lo tanto, impactar en la interpretación de los resultados (169).

Es necesaria la realización de estudios más amplios que involucren más regiones para confirmar los cambios observados en la diversidad bacteriana. La obtención de datos restringidos es una limitación que se encuentra comúnmente en los estudios que involucran el microbioma, ya que solo unos pocos analizan la totalidad del gen *16S rRNA* (170). Además, el uso de técnicas de secuenciación masiva de alto rendimiento permitiría capturar una colección más significativa de ASVs en las muestras de esputo, y debería tenerse en cuenta para futuras investigaciones(171).

Se sugiere también la posibilidad de realizar estudios longitudinales en pacientes con bronquiectasias, para seguir la evolución del microbioma y los cambios en la carga de PA a lo largo de la enfermedad. En línea con esto, un estudio reciente de nuestro grupo de investigación se demostró que la presencia de fenotipo mucóide de PA conlleva propiedades viscoelásticas específicas en comparación con controles de BQ sin PA (125). Según dichos estudios, estos hechos pueden explicarse por la propiedad que adquiere la PA de alterar el esputo, haciéndolo más viscoso y rígido y provocando un aclaramiento

mucoiliar deficiente. Así, la mucoide puede representar un criterio de temporalidad, traduciendo la cronicidad de la colonización por PA (125). Correlacionar la carga de PA con cambios en su fenotipo y flora concomitante podría representar una interesante línea de investigación en el futuro (124).

En conclusión, el patógeno debe dejar de entenderse como un único organismo aislado y, por tanto, debe considerarse como parte de la comunidad de microorganismos que viven dentro de un ecosistema específico. Este enfoque es factible hoy en día gracias a la revolución creada por los análisis metagenómicos. En este estudio, la secuenciación de *16S rRNA* en muestras de esputo de pacientes con bronquiectasias mostró una relación significativa entre la presencia de alta carga de PA y la disminución de la diversidad, abundancia y variabilidad de la flora concomitante. En este sentido, el agrupamiento de la carga de PA puede representar un biomarcador microbiano potencial de baja diversidad y pérdida del proceso biológico del microbioma pulmonar involucrado en el sistema inmunológico representado como un patobioma dominante relacionado con la gravedad de las bronquiectasias (172).

Estos hallazgos brindan la base para futuros análisis que evalúen, como primer paso, los mecanismos involucrados en la evolución del patobioma, determinados por factores microbianos, del huésped y ambientales; y en segundo lugar, evaluar el impacto de la microbiota de las vías respiratorias en la progresión y el resultado de las bronquiectasias. Esto conduciría a un potencial prometedor para mejorar la comprensión y el tratamiento de las bronquiectasias, una enfermedad respiratoria crónica poco conocida.

Profundizando en la influencia de PA en la microbiota respiratoria en BQ el siguiente objetivo del trabajo fue observar si según el fenotipo de PA (mucoide y no mucoide) se identificaba también una disbiosis dominada por un patobioma de PA.

En el 3er estudio de la asociación de la microbiota con el fenotipo mucoide de PA, nuestros resultados muestran por primera vez el patobioma respiratorio asociado al fenotipo mucoide, típico de las biopelículas de PA en pacientes con BQ sin FQ. Por lo tanto, representa un cambio de paradigma ya que llama a la necesidad de diagnosticar el fenotipo de PA, que se encuentra infravalorado en la práctica clínica, para conocer la etapa de disbiosis del microbioma durante el curso de una enfermedad respiratoria crónica. En línea con lo anterior, nuestros resultados demuestran cómo las biopelículas de PA son una materia central no sólo en la fibrosis-quística (FQ) sino también en la BQ y probablemente en otras enfermedades respiratorias crónicas en las que se demuestra el patobioma asociado al fenotipo mucoide de la PA. Este hallazgo refuerza la importancia del rendimiento diagnóstico en infecciones asociadas a biopelículas no reconocidas que no se detectan adecuadamente mediante cultivos SOC.

Investigaciones previas en pacientes con FQ han relacionado la infección crónica por PA con una mayor mortalidad a largo plazo (173). Otros han propuesto un sistema de estratificación basado en taxones dominantes para predecir futuras agudizaciones sin distinguir entre el análisis de mucoides versus no mucoides (174). Nuestro enfoque nos permitió demostrar por primera vez que el fenotipo PA mucoide en comparación con el no mucoide está asociado con una disminución significativa en la biodiversidad y la composición de la flora, por lo que lo llamamos "el patobioma mucoide". Este hallazgo tiene aplicaciones importantes para los pacientes en riesgo de desarrollar una infección crónica por PA, siendo el principal la utilidad del fenotipo mucoide PA como marcador de mal pronóstico.

En relación a la inferencia metabólica analizada con la base de "pathways" KEGG y

MetaCyc, no se obtuvieron correlaciones metabólicas agrupando esta inferencia por fenotipo de PA (mucoide y no mucoide), es decir, no reflejaron ninguna ruta asociada al fenotipo. Se observa una tendencia en las puntuaciones más altas de procesos metabólicos asociadas a degradación y síntesis de ácidos grasos, pero no es concluyente para determinar su asociación a él fenotipo de PA. Por lo que el fenotipo del patógeno parece no estar relacionado con la predominancia de alguna ruta metabólica determinada (117).

Sin embargo, la n de 34 muestras es pequeña para poder encontrar rutas metabólicas predominantes según el fenotipo para ello esta línea continuará en el futuro del grupo con el fin de hallar respuesta a la hipótesis 4 de esta tesis.

Por lo tanto, nuestros resultados llaman a la necesidad de reconocer la infección por PA en BQ, como una infección respiratoria por biopelícula y aplicar los métodos de diagnóstico recomendados para las infecciones por biopelícula. Es crucial comprender la fisiopatología de las vías respiratorias de la PA, no sólo en pacientes con FQ sino también en otras enfermedades respiratorias no FQ con mayor riesgo del patobioma mucoide e implementar técnicas de diagnóstico de alta precisión y evitar el patobioma mucoide. De especial interés son la EPOC y los BQ no FQ porque en ambos casos se altera la eliminación de moco y esto facilita la formación de biopelículas de PA. La estimulación del biofilm por la mucosidad se ha demostrado tanto in vitro como in vivo (175,176). Sin embargo, los pacientes adultos con BQ sin FQ tienen probabilidades potencialmente mayores de no volverse colonizados crónicamente cuando la PA se erradica de manera temprana en comparación con los pacientes con FQ colonizados al principio de su infancia.

En resumen, el patobioma mucoide representa una etapa de la enfermedad crónica en la que se encuentra una disminución significativa de la biodiversidad de las vías

respiratorias, dominada por taxones PA, de fenotipo mucoide, típicos de biopelículas, difíciles de aislar por cultivos SOC y fácilmente detectables por cultivos recomendados para infecciones por biopelículas. El significado clínico de los síntomas debe redefinirse adecuadamente de acuerdo con la etapa de disbiosis del microbioma respiratorio. El primer paso para detener esta cascada de eventos desafortunados que conducen al patobioma mucoide implica la erradicación temprana de PA. Pero para que esto ocurra, primero debemos identificar las infecciones por PA en BQ como una infección asociada a las biopelículas y, posteriormente, utilizar los métodos de microbiología recomendados para las infecciones por biopelículas. Actualmente este tipo de métodos diagnósticos para la detección de biopelículas están infradiagnosticados.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta tesis son:

1. Cada región hipervariable *16S rRNA* proporciona diferencias significativas en la identificación taxonómica bacteriana. En particular, nuestros resultados sugieren que V1V2 en lugar de V3V4 exhibe un mayor poder de resolución para la identificación de taxonomía del esputo.
2. Los protocolos como las plataformas de secuenciación Nanopore que involucran el *16S rRNA* de longitud completa deben estar más disponibles y mejorar las tasas de error. Mientras tanto, V1V2 se puede utilizar para la identificación taxonómica en el esputo, ya que tiene el poder de resolución más alto entre las otras hipervariables. Illumina Miseq en el perfilado del gen *16S rRNA* no puede secuenciar más de 300 pb de tamaño, por lo que con esta tecnología no se puede cubrir todo el gen completo
3. Aunque se considera infección ≥ 6 LogCFU/mL, existe una disbiosis en >5 LogCFU/mL, por lo que la disminución de la diversidad microbiana y la aparición del patobioma aparecen mucho antes del corte establecido como infección.
4. La agrupación >5 LogCFU/mL de *Pseudomonas aeruginosa* puede representar un biomarcador microbiano potencial de disbiosis de baja diversidad y dominante del patobioma relacionado con la gravedad en pacientes con bronquiectasias
5. El patobioma mucosoide representa una etapa de la enfermedad crónica en la que se encuentra una disminución significativa de la biodiversidad de las vías respiratorias, dominada por *Pseudomonas aeruginosa* mucosoide, típicos de biopelículas, difíciles de aislar por cultivos SOC y fácilmente detectables por cultivos recomendados para infecciones por biopelículas.

6. Para detener esta cascada de eventos desafortunados que conducen al patobioma mucoide se debe realizar un diagnóstico temprano de *Pseudomonas aeruginosa* mucoide para su su erradicación. EL diagnostico del fenotipo mucoide de *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra infradiagnosticado, Para su erradicación se deben aumentar los diagnósticos de microbiología recomendados para las infecciones por biopelículas.

7. Futuros estudios con mayor tamaño muestral dirigidos a descifrar con el fenotipo mucoide y el patobioma se asocian a rutas metabólicas diferenciadas en el huésped son de interés para continuar el camino emprendido con la presente tesis doctoral.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

1. Chalmers JD, Chang AB, Chotirmall SH, Dhar R, McShane PJ. Bronchiectasis. *Nat Rev Dis Primers* . 2018 Dec 1;4(1).
2. Smith MP. Diagnosis and management of bronchiectasis. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal* . 2017 Jun 6;189(24):E828.
3. King PT. The pathophysiology of bronchiectasis. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* . 2009;4:411.
4. Monteagudo M, Rodríguez-Blanco T, Barrecheguren M, Simonet P, Miravittles M. Prevalence and incidence of bronchiectasis in Catalonia, Spain: A population-based study. *Respiratory Medicine*. 2016 Dec 1;121:26–31.
5. Morrissey BM, Harper RW. Bronchiectasis: Sex and gender considerations. Vol. 25, *Clinics in Chest Medicine*. Clin Chest Med. 2004 Jun;25(2):361-72.
6. Finch S, Shoemark A, Dicker AJ, Keir HR, Smith A, Ong S, et al. Pregnancy zone protein is associated with airway infection, neutrophil extracellular trap formation, and disease severity in bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* . 2019 Oct 15 ;200(8):992–1001.
7. McShane PJ, Naureckas ET, Tino G, Strek ME. Non-cystic fibrosis bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* . 2013 Sep 15 ;188(6):647–56.
8. Gavazzi G, Krause KH. Ageing and infection. *Lancet Infectious Diseases*. 2002 Nov 1;2(11):659–66.
9. Dimakou K, Triantafillidou C, Toumbis M, Tsikritsaki K, Malagari K, Bakakos P. Non CF-bronchiectasis: Aetiologic approach, clinical, radiological, microbiological and functional profile in 277 patients. *Respir Med* . 2016 Jul 1 ;116:1–7.
10. Chalmers JD, Aliberti S, Polverino E, Vendrell M, Crichton M, Loebinger M, et al. The EMBARC European Bronchiectasis Registry: protocol for an international observational study. *ERJ Open Res* . 2016 Mar 31 ;2(1).
11. Visser SK, Bye P, Morgan L. Management of bronchiectasis in adults. *Med J Aust*. 2018 Aug 20;209(4):177-183.
12. Bush A, Floto RA. Pathophysiology, causes and genetics of paediatric and adult bronchiectasis. *Respirology*. 2019 Nov;24(11):1053-1062.
13. Saleh AD, Chalmers JD, De Soyza A, Fardon TC, Koustas SO, Scott J, et al. The heterogeneity of systemic inflammation in bronchiectasis. *Respir Med*. 2017 Jun;127:33-39.
14. Chalmers JD, Aliberti S, Blasi F. Management of bronchiectasis in adults. *European Respiratory Journal* . 2015 May 1 ;45(5):1446–62.

15. Chandrasekaran R, mac Aogáin M, Chalmers JD, Elborn SJ, Chotirmall SH. Geographic variation in the aetiology, epidemiology and microbiology of bronchiectasis. *BMC Pulmonary Medicine* 2018 18:1 . 2018 May 22 ;18(1):1–14.
16. Amati F, Simonetta E, Gramegna A, Tarsia P, Contarini M, Blasi F, et al. The biology of pulmonary exacerbations in bronchiectasis. *Eur Respir Rev.* 2019 Nov 20;28(154):190055.
17. Lonni S, Chalmers JD, Goeminne PC, McDonnell MJ, Dimakou K, De Soyza A, et al. Etiology of non-cystic fibrosis bronchiectasis in adults and its correlation to disease severity. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Dec;12(12):1764-70.
18. Brower KS, del Vecchio MT, Aronoff SC. The etiologies of non-CF bronchiectasis in childhood: A systematic review of 989 subjects. *BMC Pediatrics* . 2014 Dec 10 ;14(1):1–8.
19. Kwak HJ, Moon JY, Choi YW, Kim TH, Sohn JW, Yoon HJ, et al. High prevalence of bronchiectasis in adults: Analysis of CT findings in a health screening program. *Tohoku J Exp Med.* 2010 Dec;222(4):237-42.
20. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clinical and Experimental Allergy.* 2013 Aug;43(8):850–73.
21. Bienvenu T, Sermet-Gaudelus I, Burgel PR, Hubert D, Crestani B, Bassinet L, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2010 May 15;181(10):1078–84.
22. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SEH, Green CG, et al. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* . 2005 Feb 2 ;293(5):581–8.
23. Mirra V, Werner C, Santamaria F. Primary ciliary dyskinesia: An update on clinical aspects, genetics, diagnosis, and future treatment strategies. *Frontiers in Pediatrics.* 2017 Jun 9;5.
24. Soto-Cardenas MJ, Perez-De-Lis M, Bove A, Navarro C, Brito-Zeron P, Diaz-Lagares C, et al. Bronchiectasis in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Sep-Oct;28(5):647-53.
25. Puéchal X, Bienvenu T, Génin E, Berthelot JM, Sibilia J, Gaudin P, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with bronchiectasis associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Apr;70(4):653-9.
26. Lee AS, Lee JS, He Z, Ryu JH. Reflux-aspiration in chronic lung disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2020;17(2):155–64.
27. Polverino E, Goeminne PC, McDonnell MJ, Aliberti S, Marshall SE, Loebinger MR, et al. European Respiratory Society guidelines for the management of adult bronchiectasis. Vol. 50, *European Respiratory Journal. Eur Respir J.* 2017 Sep 9;50(3):1700629.
28. Juliusson G, Gudmundsson G. Diagnostic imaging in adult non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Breathe* . 2019 Sep 1 ;15(3):190.
29. Lonni S, Chalmers JD, Goeminne PC, et al. Etiology of non-cystic fibrosis bronchiectasis in adults and its correlation to disease severity. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12(12):1764–1770.

30. King PT, Holdsworth SR, Freezer NJ, Villanueva E, Holmes PW. Microbiologic follow-up study in adult bronchiectasis. *Respir Med* . 2007 Aug ;101(8):1633–8.
31. Munro KA, Reed PW, Joyce H, Perry D, Twiss J, Byrnes CA, et al. Do New Zealand children with non-cystic fibrosis bronchiectasis show disease progression? *Pediatric Pulmonology*. 2011 Feb;46(2):131–8.
32. McDonnell MJ, Jary HR, Perry A, Macfarlane JG, Hester KLM, Small T, et al. Non cystic fibrosis bronchiectasis: A longitudinal retrospective observational cohort study of *Pseudomonas* persistence and resistance. *Respir Med* . 2015 Jun 1 ;109(6):716–26.
33. Evans SA, Turner SM, Bosch BJ, Hardy CC, Woodhead MA. Lung function in bronchiectasis: the influence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J* . 1996 ;9(8):1601–4.
34. Martínez-García MA, Soler-Cataluña J-J, Perpiñá-Tordera M, Román-Sánchez P, Soriano J. Factors associated with lung function decline in adult patients with stable non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Chest* 2007;132(05):1565–1572.
35. Nicotra MB, Rivera M, Dale AM, Shepherd R, Carter R. Clinical, pathophysiologic, and microbiologic characterization of bronchiectasis in an aging cohort. *Chest* 1995;108(04):955–961.
36. Pasteur MC, Helliwell SM, Houghton SJ, Webb SC, Foweraker JE, Coulden RA, et al. An investigation into causative factors in patients with bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* . 2000 ;162(4 I):1277–84.
37. Angrill J, Agustí C, de Celis R, Rañó A, Gonzalez J, Solé T, et al. Bacterial colonisation in patients with bronchiectasis: microbiological pattern and risk factors. *Thorax* . 2002 ;57(1):15–9.
38. Tunney MM, Einarsson GG, Wei L, et al. Lung microbiota and bacterial abundance in patients with bronchiectasis when clinically stable and during exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187(10):1118–1126.
39. Menéndez R, Méndez R, Amara-Elori I, Reyes S, Montull B, Feced L, et al. Systemic Inflammation during and after Bronchiectasis Exacerbations: Impact of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Medicine* . 2020 ;9(8):1–15.
40. Aliberti S, Lonni S, Dore S, et al. Clinical phenotypes in adult patients with bronchiectasis. *Eur Respir J* 2016;47(04): 1113–1122.
41. Martínez-García MA, Vendrell M, Girón R, Máiz-Carro L, de La Rosa Carrillo D, de Gracia J, et al. The multiple faces of non-cystic fibrosis bronchiectasis a cluster analysis approach. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Sep 1;13(9):1468–75.
42. Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 1977; (262):1–96.
43. Miskiel KA, Wells AU, Rubens MB, Cole PJ, Hansell DM. Effects of airway infection by *Pseudomonas aeruginosa*: a computed tomographic study. *Thorax* . 1997 ;52(3):260.
44. Wilson CB, Jones PW, O’Leary CJ, Hansell DM, Cole PJ, Wilson R. Effect of sputum bacteriology on the quality of life of patients with bronchiectasis. *Eur Respir J* . 1997 Aug ;10(8):1754–60.
45. Polverino E, Goeminne PC, McDonnell MJ, et al. European Respiratory Society guidelines for the management of adult bronchiectasis. *Eur Respir J* 2017;50(03):1700629.

46. Finch S, McDonnell MJ, Abo-Leyah H, Aliberti S, Chalmers JD. A comprehensive analysis of the impact of *Pseudomonas aeruginosa* colonization on prognosis in adult bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc* . 2015 Nov 1 ;12(11):1602–11.
47. Gallego M, Pomares X, Espasa M, Castañer E, Solé M, Suárez D, et al. *Pseudomonas aeruginosa* isolates in severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization and risk factors. *BMC Pulm Med* . 2014 Jun 26 ;14(1).
48. Suarez-Cuartin G, Smith A, Abo-Leyah H, et al. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgG antibodies and chronic airway infection in bronchiectasis. *Respir Med* 2017;128:1–6.
49. Lee SH, Lee Y, Park JS, Cho YJ, Yoon H il, Lee CT, et al. Characterization of Microbiota in Bronchiectasis Patients with Different Disease Severities. *Journal of Clinical Medicine* . 2018 Nov 9 ;7(11).
50. Woo TE, Lim R, Heirali AA, Acosta N, Rabin HR, Mody CH, et al. A longitudinal characterization of the Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis airway microbiome. *Sci Rep* . 2019 Dec 1 ;9(1).
51. Rogers GB, Bruce KD, Martin ML, Burr LD, Serisier DJ. The effect of long-term macrolide treatment on respiratory microbiota composition in non-cystic fibrosis bronchiectasis: an analysis from the randomised, double-blind, placebo-controlled BLESS trial. *Lancet Respir Med* 2014;2(12):988–996.
52. Høiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros* . 2005 Aug ;4 Suppl 2(2 SUPPL.):49–54.
53. Bartell JA, Sommer LM, Marvig RL, Skov M, Pressler T, Molin S, et al. Omics-based tracking of *Pseudomonas aeruginosa* persistence in “eradicated” cystic fibrosis patients. *European Respiratory Journal* . 2021 Apr 1 ;57(4).
54. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* (1979). 1999 May 21;284(5418):1318–22.
55. Proesmans M, Balinska-Miskiewicz W, Dupont L, et al. Evaluating the “Leeds criteria” for *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis centre. *Eur Respir J* 2006;27(05):937–943.
56. Caçador NC, Paulino da Costa Capizzani C, Monteiro Marin Torres LAG, Galetti R, Ciofu O, Lúcia da Costa Darini A, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the chronic phenotype by mutations in the *algTmucABD* operon in isolates from Brazilian cystic fibrosis patients. *PLoS ONE* . 2018 Nov 1 ;13(11).
57. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2007 Jan;5(1):48–56.
58. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* . 2015 May 1 ;21 Suppl 1(S1):S1–25.
59. Marsh RL, Thornton RB, Smith-Vaughan HC, Richmond P, Pizzutto SJ, Chang AB. Detection of biofilm in bronchoalveolar lavage from children with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Pediatr Pulmonol* 2015;50(03):284–292.
60. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2012;10(12):841–851

61. Raj AA, Birring SS, Green R, Grant A, de Caestecker J, Pavord ID. Prevalence of inflammatory bowel disease in patients with airways disease. *Respiratory Medicine*. 2008 May;102(5):780–5.
62. Hill AT, Haworth CS, Aliberti S, Barker A, Blasi F, Boersma W, et al. Pulmonary exacerbation in adults with bronchiectasis: a consensus definition for clinical research. *Eur Respir J*. 2017 Jun 8;49(6):1700051.
63. Anwar GA, Bourke SC, Afolabi G, Middleton P, Ward C, Rutherford RM. Effects of long-term low-dose azithromycin in patients with non-CF bronchiectasis. *Respir Med* . 2008 Oct ;102(10):1494–6.
64. Quint JK, Millett ERC, Joshi M, Navaratnam V, Thomas SL, Hurst JR, et al. Changes in the incidence, prevalence and mortality of bronchiectasis in the UK from 2004 to 2013: A population-based cohort study. *Eur Respir J*. 2016 Jan;47(1):186-93.
65. Martínez-García MA, Soler-Cataluña JJ, Perpiñá-Tordera M, Román-Sánchez P, Soriano J. Factors associated with lung function decline in adult patients with stable non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Chest*. 2007 Nov;132(5):1565-72.
66. Chalmers JD, Goeminne P, Aliberti S, McDonnell MJ, Lonni S, Davidson J, et al. The bronchiectasis severity index an international derivation and validation study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2014 Mar 1;189(5):576–85.
67. McDonnell MJ, Aliberti S, Goeminne PC, Dimakou K, Zucchetti SC, Davidson J, et al. Multidimensional severity assessment in bronchiectasis: an analysis of seven European cohorts. *Thorax* . 2016 Dec 1 ;71(12):1110–8.
68. Finch S, McDonnell MJ, Abo-Leyah H, Aliberti S, Chalmers JD. A comprehensive analysis of the impact of pseudomonas aeruginosa colonization on prognosis in adult bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc* . 2015 Nov 1 ;12(11):1602–11.
69. Tiew PY, Jaggi TK, Chan LLY, Chotirmall SH. The airway microbiome in COPD, bronchiectasis and bronchiectasis-COPD overlap. *Clin Respir J* . 2021 Feb 1 ;15(2):123–33.
70. Wilson CB, Jones PW, O’Leary CJ, Cole PJ, Wilson R. Validation of the St. George’s respiratory questionnaire in bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997;156(2 I):536–41.
71. Quittner AL, O’Donnell AE, Salathe MA, Lewis SA, Li X, Montgomery AB, et al. Quality of Life Questionnaire-Bronchiectasis: final psychometric analyses and determination of minimal important difference scores. *Thorax* . 2015 Jan 1 ;70(1):12–20.
72. Murray MP, Turnbull K, MacQuarrie S, Pentland JL, Hill AT. Validation of the Leicester Cough Questionnaire in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Eur Respir J* . 2009 Jul ;34(1):125–31.
73. Martínez-García MÁ, Soler-Cataluña JJ, Sanz YD, Serra PC, Lerma MA, Vicente JB, et al. Factors associated with bronchiectasis in patients with COPD. *Chest*. 2011 Nov;140(5):1130-1137.
74. King PT, Holdsworth SR, Freezer NJ, Villanueva E, Holmes PW. Characterisation of the onset and presenting clinical features of adult bronchiectasis. *Respir Med* . 2006 Dec ;100(12):2183–9.
75. Hill AT, Sullivan AL, Chalmers JD, de Soyza A, Stuart Elborn J, Andres Floto R, et al. British Thoracic Society Guideline for bronchiectasis in adults. *Thorax* . 2019 Jan 1 ;74(Suppl 1):1–69.

76. Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Finch S, Furrrie E, et al. Neutrophil elastase activity is associated with exacerbations and lung function decline in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 May 15;195(10):1384-1393.
77. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc*. 1975 Jun;50(6):339-44
78. EUCAST: EUCAST Breakpoints v 9.0 (2019) available . Available from: https://www.eucast.org/eucast_news/news_singleview/?tx_ttnews%5Btt_news%5D=299&cHash=c0a2b312e42eb8e9bd88c4e1d1cd466c
79. Camoez M, Sierra JM, Dominguez MA, Ferrer-Navarro M, Vila J, Roca I. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* . 2016 Feb 1;22(2):161.e1-161.e7.
80. Araújo D, Shteinberg M, Aliberti S, Goeminne PC, Hill AT, Fardon TC, et al. The independent contribution of *Pseudomonas aeruginosa* infection to long-term clinical outcomes in bronchiectasis. *Eur Respir J* . 2018 Feb 1 ;51(2).
81. Whitters D, Stockley R. Immunity and bacterial colonisation in bronchiectasis. *Thorax* . 2012 ;67(11):1006–13.
82. Cullen L, McClean S. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathogens* . 2015 Mar 2 ;4(1):66–89.
83. Chalmers JD, Hill AT. Mechanisms of immune dysfunction and bacterial persistence in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Mol Immunol* 2013;55(01):27–34.
84. Gao J, Gao X, Kong L. To investigate the prevention of OM-85 on bronchiectasis exacerbations (iPROBE) in Chinese patients: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014 Apr 29;15(1).
85. Vallières E, Tumelty K, Tunney MM, Hannah R, Hewitt O, Stuart Elborn J, et al. Efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* eradication regimens in bronchiectasis. *Eur Respir J* . 2017 Apr 1 ;49(4).
86. Orriols R, Hernando R, Ferrer A, Terradas S, Montoro B. Eradication Therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. *Respiration* . 2015 Oct 1 ;90(4):299–305.
87. Bell SC, Elborn JS, Byrnes CA. Bronchiectasis: Treatment decisions for pulmonary exacerbations and their prevention. *Respirology* . 2018 Nov 1 ;23(11):1006–22.
88. Courtney JM, Kelly MG, Watt A, Garske L, Bradley J, Ennis M, et al. Quality of life and inflammation in exacerbations of bronchiectasis. *Chron Respir Dis* . 2008 Aug ;5(3):161–8.
89. Kapur N, Grimwood K, Masters IB, Morris PS, Chang AB. Lower airway microbiology and cellularity in children with newly diagnosed non-CF bronchiectasis. *Pediatr Pulmonol* 2012;47(03):300–307.
90. Quittner AL, O'Donnell AE, Salathe MA, Lewis SA, Li X, Montgomery AB, et al. Quality of Life Questionnaire-Bronchiectasis: final psychometric analyses and determination of minimal important difference scores. *Thorax* . 2015 Jan 1 ;70(1):12–20.

91. Spinou A, Siegert RJ, Guan WJ, Patel AS, Gosker HR, Lee KK, et al. The development and validation of the Bronchiectasis Health Questionnaire. *European Respiratory Journal* . 2017 May 1 ;49(5):1601532.
92. Hess JF, Kohl TA, Kotrová M, Rönsch K, Paprotka T, Mohr V, et al. Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotechnology Advances*. 2020 Jul 1;41:107537.
93. Beck TF, Mullikin JC, Biesecker LG. Systematic Evaluation of Sanger Validation of NextGen Sequencing Variants. *Clin Chem* . 2016 Apr 1 ;62(4):647.
94. Mansfield AS, Park BH, Mullane MP. Identification, Prioritization, and Treatment of Mutations Identified by Next-Generation Sequencing. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2018 May;(38):873–80.
95. Pylro VS, Roesch LFW, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótoła MR. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *Journal of Microbiological Methods*. 2014 Dec 1;107:30–7.
96. Cox MJ, Turek EM, Hennessy C, Mirza GK, James PL, Coleman M, et al. Longitudinal assessment of sputum microbiome by sequencing of the 16S rRNA gene in non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. *PLOS ONE* . 2017 Feb 1 ;12(2):e0170622.
97. Nguyen NP, Warnow T, Pop M, White B. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *npj Biofilms and Microbiomes* 2016 2:1 . 2016 Apr 20 ;2(1):1–8.
98. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 2017 11:12 . 2017 Jul 21 ;11(12):2639–43.
99. Jeske JT, Gallert C. Microbiome Analysis via OTU and ASV-Based Pipelines-A Comparative Interpretation of Ecological Data in WWTP Systems. *Bioengineering (Basel)* . 2022 Apr 1 ;9(4).
100. Wang GCY, Wang Y. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology (N Y)*. 1996;142(5):1107–14.
101. Mysara M, Saeys Y, Leys N, Raes J, Monsieurs P. CATCh, an ensemble classifier for chimera detection in 16s rRNA sequencing studies. *Applied and Environmental Microbiology* . 2015 Dec 19 ;81(5):1573–84.
102. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* . 2011 Aug 15 ;27(16):2194–200.
103. Acinas SG, Sarma-Rupavtarm R, Klepac-Ceraj V, Polz MF. PCR-induced sequence artifacts and bias: Insights from comparison of two 16s rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005 Dec;71(12):8966–9.
104. Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research* . 2003 Jan 1 ;31(1):442–3.

105. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, Desantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal* 2012 6:3 . 2011 Dec 1 ;6(3):610–8.
106. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* . 2013 Jan 1 ;41(D1):D590–6.
107. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 2019 Aug 1;37(8):852–7.
108. Nübel U, Garcia-Pichel F, Kühl M, Muyzer G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Appl Environ Microbiol* . 1999 ;65(2):422–30.
109. Stauffer HB. A generalization of Pielou's index of non-randomness. *J Theor Biol* . 1979 Mar 7 ;77(1):19–25.
110. Kim BR, Shin J, Guevarra RB, Lee JH, Kim DW, Seol KH, et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol* . 2017 Dec 1 ;27(12):2089–93.
111. Shin J, Noh JR, Choe D, Lee N, Song Y, Cho S, et al. Comprehensive 16S rRNA and metagenomic data from the gut microbiome of aging and rejuvenation mouse models. *Scientific Data* 2022 9:1 . 2022 May 10 ;9(1):1–7.
112. Reese AT, Dunn RR. Drivers of Microbiome Biodiversity: A Review of General Rules, Feces, and Ignorance. *mBio* . 2018 Jul 1 ;9(4).
113. Li Y, Hu X, Yang S, Zhou J, Qi L, Sun X, et al. Comparison between the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic captive musk deer. *Frontiers in Microbiology*. 2018 Mar 2;9(MAR):300.
114. Flores R, Shi J, Gail MH, Gajer P, Ravel J, Goedert JJ. Assessment of the human faecal microbiota: II. Reproducibility and associations of 16S rRNA pyrosequences. *European Journal of Clinical Investigation* . 2012 Aug 1 ;42(8):855–63.
115. Qian XB, Chen T, Xu YP, Chen L, Sun FX, Lu MP, et al. A guide to human microbiome research: Study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chinese Medical Journal* . 2020 ;133(15):1844–55.
116. Walters KE, Martiny JBH. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLoS ONE* . 2020 Sep 1 ;15(9).
117. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions Douglas, Gavin M ; Maffei, Vincent J ; Zaneveld, Jesse R ; Yurgel, Svetlana N ; Brown, James R ; Taylor, Christopher M ; Huttenhower, Curtis ; Langille, Morgan G I *Nature biotechnology*, 2020-06, Vol.38 (6), p.685-688.
118. Altman T, Travers M, Kothari A, Caspi R, Karp PD. A systematic comparison of the MetaCyc and KEGG pathway databases. *BMC Bioinformatics*. 2013 Mar 27;14.
119. Sun S, Jones RB, Fodor AA. Inference-based accuracy of metagenome prediction tools varies across sample types and functional categories. *Microbiome*. 2020 Apr 2;8(1).

120. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 2015 3:1 . 2015 Jul 30 ;3(1):1–3.
121. Koonin E v. Origin of eukaryotes from within archaea, archaeal eukaryome and bursts of gene gain: eukaryogenesis just made easier? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* . 2015 Sep 9 ;370(1678).
122. Chotirmall SH. One small step for neutrophils, one giant leap for bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* . 2018 Oct 1 ;198(7):828–30.
123. McDonnell MJ, Jary HR, Perry A, Macfarlane JG, Hester KLM, Small T, et al. Non cystic fibrosis bronchiectasis: A longitudinal retrospective observational cohort study of *Pseudomonas* persistence and resistance. *Respir Med* . 2015 Jun 1 ;109(6):716–26.
124. Luo RG, Miao XY, Luo LL, Mao B, Yu FY, Xu JF. Presence of *pldA* and *exoU* in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is associated with high risk of exacerbations in non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. *Clin Microbiol Infect* . 2019 May 1 ;25(5):601–6.
125. Alcaraz-Serrano V, Fernández-Barat L, Scioscia G, Llorens-Llacuna J, Gimeno-Santos E, Herrero-Cortina B, et al. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* alters sputum viscoelasticity in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Respir Med* . 2019 Jul 1 ;154:40–6.
126. Rogers GB, van der Gast CJ, Cuthbertson L, Thomson SK, Bruce KD, Martin ML, et al. Clinical measures of disease in adult non-CF bronchiectasis correlate with airway microbiota composition. *Thorax* . 2013 ;68(8):731–7.
127. Tiew PY, Jaggi TK, Chan LLY, Chotirmall SH. The airway microbiome in COPD, bronchiectasis and bronchiectasis-COPD overlap. *Clin Respir J* . 2021 Feb 1 ;15(2):123–33.
128. Byun MK, Chang J, Kim HJ, Jeong SH. Differences of lung microbiome in patients with clinically stable and exacerbated bronchiectasis. *PLOS ONE* . 2017 Aug 1 ;12(8):e0183553.
129. Paudel KR, Dharwal V, Patel VK, Galvao I, Wadhwa R, Malya V, et al. Role of Lung Microbiome in Innate Immune Response Associated With Chronic Lung Diseases. *Frontiers in Medicine*. 2020 Sep 18;7.
130. Aogáin M mac, Chandrasekaran R, Hou Lim AY, Low TB, Tan GL, Hassan T, et al. Immunological corollary of the pulmonary mycobioime in bronchiectasis: the CAMEB study. *Eur Respir J* . 2018 ;52(1).
131. Flume P, Chalmers J, Lancet KOT, 2018 undefined. Advances in bronchiectasis: endotyping, genetics, microbiome, and disease heterogeneity. *Lancet*. 2018 Sep 8;392(10150):880-890.
132. Morosyuk S v., Lee KS, SantaLucia J, Cunningham PR. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA: analysis of the stem nucleotides. *J Mol Biol* . 2000 Jun 30 ;300(1):113–26.
133. Schluenzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, et al. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* . 2000 Sep 1 ;102(5):615–23.
134. Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* . 1998 ;64(2):795–9.

135. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* . 2007 May ;69(2):330–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17391789/>
136. Mukherjee C, Beall CJ, Griffen AL, Leys EJ. High-resolution ISR amplicon sequencing reveals personalized oral microbiome. *Microbiome* . 2018 Sep 5 ;6(1):1–15.
137. Yang D, Xing Y, Song X, Qian Y. The impact of lung microbiota dysbiosis on inflammation. *Immunology* . 2020 Feb 1 ;159(2):156–66.
138. Richardson H, Dicker AJ, Barclay H, Chalmers JD. The microbiome in bronchiectasis. *European Respiratory Review* . 2019 Sep 30 ;28(153).
139. Gramegna A, Amati F, Terranova L, Sotgiu G, Tarsia P, Miglietta D, et al. Neutrophil elastase in bronchiectasis. *Respiratory Research*. 2017 Dec 19;18(1).
140. Chalmers JD, McHugh BJ, Docherty C, Govan JRW, Hill AT. Vitamin-D deficiency is associated with chronic bacterial colonisation and disease severity in bronchiectasis. *Thorax*. 2013 Jan;68(1):39-47.
141. Everaerts S, Lagrou K, Dubbeldam A, Lorent N, Vermeersch K, van Hoeyveld E, et al. Sensitization to *Aspergillus fumigatus* as a risk factor for bronchiectasis in COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* . 2017 Aug 31 ;12:2629.
142. Dodi G, Attanasi M, di Filippo P, di Pillo S, Chiarelli F. Virome in the Lungs: The Role of Anelloviruses in Childhood Respiratory Diseases. *Microorganisms* . 2021 Jul 1 [cited 2022 Jul 18];9(7).
143. Wypych, T.P., Wickramasinghe, L.C. & Marsland, B.J. The influence of the microbiome on respiratory health. *Nat Immunol*. 2019 Oct;20(10):1279-1290. doi: 10.1038/s41590-019-0451-9
144. Toraldo DM, Conte L. Influence of the Lung Microbiota Dysbiosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations: The Controversial Use of Corticosteroid and Antibiotic Treatments and the Role of Eosinophils as a Disease Marker. *J Clin Med Res* . 2019 ;11(10):667–75.
145. Barnes, P., Burney, P., Silverman, E. et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Dec 3;1:15076.
146. Filho FSL, Alotaibi NM, Ngan D, Tam S, Yang J, Hollander Z, et al. Sputum microbiome is associated with 1-year mortality after chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019 May 15;199(10):1205–13.
147. Yadava K, Pattaroni C, Sichelstiel AK, Trompette A, Gollwitzer ES, Salami O, et al. Microbiota promotes chronic pulmonary inflammation by enhancing IL-17A and autoantibodies. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016 May 1;193(9):975–87.
148. Wang Z, Singh R, Miller BE, Tal-Singer R, van Horn S, Tomsho L, et al. Sputum microbiome temporal variability and dysbiosis in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: an analysis of the COPDMap study. *Thorax* . 2018 Apr 1 ;73(4):331–8.
149. Lee S do, Huang MS, Kang J, Lin CH, Park MJ, Oh YM, et al. The COPD assessment test (CAT) assists prediction of COPD exacerbations in high-risk patients. *Respir Med* . 2014 [cited 2022 Jul 18];108(4):600–8.

150. Keir HR, Dicker A, Lonergan M, Crichton M, Miller BE, Tal-Singer R, et al. Clinical endotypes of exacerbation are associated with differences in microbial composition and diversity in COPD. *Eur Respir J*. 2020 Oct 29;56(4):2000391
151. Contoli M, Pauletti A, Rossi MR, Spanevello A, Casolari P, Marcellini A, et al. Long-term effects of inhaled corticosteroids on sputum bacterial and viral loads in COPD. *Eur Respir J* . 2017 Oct 1 ;50(4).
152. Jacobs MC, Lankelma JM, Wolff NS, Hugenholtz F, de Vos AF, van der Poll T, et al. Effect of antibiotic gut microbiota disruption on LPS-induced acute lung inflammation. *PLoS One* . 2020 Nov 1 [cited 2022 Jul 18];15(11).
153. Mortaz E, Adcock IM, Folkerts G, Barnes PJ, Paul Vos A, Garssen J. Probiotics in the management of lung diseases. *Mediators Inflamm* . 2013 ;2013.
154. Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, et al. Neutrophil elastase activity is associated with exacerbations and lung function decline in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195 (10):1384–1393
155. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
156. García-López R, Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Cota-Huizar A, Sotelo-Mundo RR, Gómez-Gil B, et al. Otus and asvs produce comparable taxonomic and diversity from shrimp microbiota 16s profiles using tailored abundance filters. *Genes (Basel)* . 2021 Apr 1 ;12(4).
157. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* . 2011 Jun 24 ;12(6).
158. Murray MP, Pentland JL, Turnbull K, MacQuarrie S, Hill AT. Sputum colour: a useful clinical tool in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *European Respiratory Journal* . 2009 Aug 1 ;34(2):361–4.
159. Chalmers JD, Aliberti S, Polverino E, Vendrell M, Crichton M, Loebinger M, et al. The EMBARC european bronchiectasis registry: Protocol for an international observational study. *ERJ Open Res*. 2016 Jan 20;2(1):00081-2015.
160. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011 93:3 . 2011 Dec 25 ;93(3):965–74.
161. Sirichoat A, Sankuntaw N, Engchanil C, Buppasiri P, Faksri K, Namwat W, et al. Comparison of different hypervariable regions of 16S rRNA for taxonomic profiling of vaginal microbiota using next-generation sequencing. *Arch Microbiol* . 2021 Apr 1 ;203(3):1159–66.
162. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* . 2016 Mar 22 ;17(1):1–8.
163. García-López R, Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Sánchez-López F, Cota-Huizar A, Sotelo-Mundo RR, et al. Doing More with Less: A Comparison of 16S Hypervariable Regions in Search of Defining the Shrimp Microbiota. *Microorganisms* . 2020 Jan 1 ;8(1).
164. Fanning S, Proos S, Jordan K, Srikumar S. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Front Microbiol* . 2017 Sep 21 ;8(SEP).

165. Sperling JL, Silva-Brandão KL, Brandão MM, Lloyd VK, Dang S, Davis CS, et al. Comparison of bacterial 16S rRNA variable regions for microbiome surveys of ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2017 Jun 1;8(4):453–61.
166. Woo TE, Lim R, Heirali AA, Acosta N, Rabin HR, Mody CH, et al. A longitudinal characterization of the Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis airway microbiome. *Scientific Reports* 2019 9:1 . 2019 May 3 ;9(1):1–11.
167. Nearing JT, Douglas GM, Comeau AM, Langille MGI. Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ* . 2018 ;6(8).
168. Fernández-Barat L, Motos A, Ranzani OT, Bassi GL, Xiol EA, Senussi T, et al. Diagnostic Value of Endotracheal Aspirates Sonication on Ventilator-Associated Pneumonia Microbiologic Diagnosis. *Microorganisms* . 2017 Sep 1 ;5(3).
169. Darwish N, Shao J, Schreier LL, Proszkowiec-Weglarz M. Choice of 16S ribosomal RNA primers affects the microbiome analysis in chicken ceca. *Scientific Reports* 2021 11:1 . 2021 Jun 4 ;11(1):1–15.
170. Cho I, Blaser MJ. The Human Microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* . 2012 Apr ;13(4):260.
171. Nelson MT, Pope CE, Marsh RL, Wolter DJ, Weiss EJ, Hager KR, et al. Human and Extracellular DNA Depletion for Metagenomic Analysis of Complex Clinical Infection Samples Yields Optimized Viable Microbiome Profiles. *Cell Rep* . 2019 Feb 19 ;26(8):2227-2240.e5.
172. Vayssier-Taussat M, Albina E, Citti C, Cosson JF, Jacques MA, Lebrun MH, et al. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014;5(MAR):29.
173. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* . 2002 ;34(2):91–100.
174. Rogers GB, Zain NMM, Bruce KD, Burr LD, Chen AC, Rivett DW, et al. A novel microbiota stratification system predicts future exacerbations in bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(4):496–503.
175. Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK, Parsek MR. Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol* . 2006 Jan ;59(1):142–51.
176. Fernández-Barat L, Ben-Aicha S, Motos A, Vila J, Marco F, Rigol M, et al. Assessment of in vivo versus in vitro biofilm formation of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from endotracheal tubes. *Scientific Reports* 2018 8:1 . 2018 Aug 9 ;8(1):1–9.

9.ANEXOS

9. ANEXOS

ANEXO 1. Repositorio Github de los “pipelines” bioinformáticos utilizados en esta tesis.

<https://github.com/Ruben-MetagenomiXs/-Hypervariable-regions-of-16S-rRNA-with-the-highest-resolving-power-for-taxonomic-identification>

ANEXO 2. AYUDAS PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Los tres trabajos que constituyen la base de esta tesis doctoral se han realizado con el apoyo de:

La beca PFIS FI19/00090 concedida por el Instituto Carlos III asociada al proyecto FIS: FIS18-PI18/00145.

ANEXO 3. Publicaciones realizadas no directamente vinculadas a la tesis.

1. Fernández-Barat L, **López-Aladid R**, Torres A. The value of serology testing to manage SARS-CoV-2 infections. *Eur Respir J*. 2020 Aug 27;56(2):2002411. doi: 10.1183/13993003.02411-2020. PMID: 32675201; PMCID: PMC7366174.
2. Fernández-Barat L, **López-Aladid R**, Torres A. Reconsidering ventilator-associated pneumonia from a new dimension of the lung microbiome. *EBioMedicine*. 2020 Oct;60:102995. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102995. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32950001; PMCID: PMC7492164.
3. Barbeta E, Motos A, Torres A, Ceccato A, Ferrer M, Cilloniz C, Bueno L, Badia JR, Castro P, Ferrando C, Andrea R, Castellà M, Fernández J, Soriano A, Mellado R, **López-Aladid R**, Yang H, Yang M, Fernandez-Barat L, Catalina Palomeque A, Vollmer I, Nicolás JM; Covid Clinic Critical Care Group;. SARS-CoV-2-induced Acute Respiratory Distress Syndrome: Pulmonary Mechanics and Gas-Exchange Abnormalities. *Ann Am Thorac Soc*. 2020 Sep;17(9):1164-1168. doi: 10.1513/AnnalsATS.202005-462RL. PMID: 32579033; PMCID: PMC7462332.

4. Guiu A, **López-Aladid R**, Cardeñoso L, Mosquera MM, de la Cámara R, Marcos MA. Study of cytomegalovirus resistance in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Med Clin (Barc)*. 2020 Jun 12;154(11):433-439. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2019.07.027. Epub 2019 Nov 27. PMID: 31785805.

5. Dobaño C, Santano R, Jiménez A, Vidal M, Chi J, Rodrigo Melero N, Popovic M, **López-Aladid R**, Fernández-Barat L, Tortajada M, Carmona-Torre F, Reina G, Torres A, Mayor A, Carolis C, García-Basteiro AL, Aguilar R, Moncunill G, Izquierdo L. Immunogenicity and crossreactivity of antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: utility and limitations in seroprevalence and immunity studies. *Transl Res*. 2021 Jun;232:60-74. doi: 10.1016/j.trsl.2021.02.006. Epub 2021 Feb 12. PMID: 33582244; PMCID: PMC7879156.

6. Cabrera R, Fernández-Barat L, Motos A, **López-Aladid R**, Vázquez N, Panigada M, Álvarez-Lerma F, López Y, Muñoz L, Castro P, Vila J, Torres A. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains from the endotracheal tubes of patients with nosocomial pneumonia. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020 Feb 28;9(1):43. doi: 10.1186/s13756-020-0679-z. PMID: 32111258; PMCID: PMC7049205.

7. Fernández-Barat L, Motos A, Panigada M, Álvarez-Lerma F, Viña L, **Lopez-Aladid R**, Ceccato A, Bassi GL, Nicolau DP, Lopez Y, Muñoz L, Guerrero L, Soy D, Israel T, Castro P, Torres A. Comparative efficacy of linezolid and vancomycin for endotracheal tube MRSA biofilms from ICU patients. *Crit Care*. 2019 Jul 10;23(1):251. doi: 10.1186/s13054-019-2523-5. PMID: 31291978; PMCID: PMC6617612.

8. **López-Aladid R**, Guiu A, Sanclemente G, López-Medrano F, Cofán F, Mosquera MM, Torre-Cisneros J, Vidal E, Moreno A, Aguado JM, Cordero E, Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Carratalá J, Sabé N, Niubó J, Cervera C, Cervilla A, Bodro M, Muñoz P, Fariñas C, Codina MG, Aranzamendi M, Montejo M, Len O, Marcos MA; Group for Study of Infection in Transplantation of the Spanish Society of Infectious Diseases Clinical Microbiology GESITRA-SEIMC Spanish Network for Research in Infectious. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations in solid organ transplant recipients with suspected resistance. *J Clin Virol*. 2017 May;90:57-63. doi: 10.1016/j.jcv.2017.03.014. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28359845.

9. **López-Aladid R**, Guiu A, Mosquera MM, López-Medrano F, Cofán F, Linares L, Torre-Cisneros J, Vidal E, Moreno A, Aguado JM, Cordero E, Martín-Gandul C, Carratalá J, Sabé N, Niubó J, Cervera C, Capón A, Cervilla A, Santos M, Bodro M, Muñoz P, Fariñas MC, Antón A, Aranzamendi M, Montejo M, Pérez-Romero P, Len O, Marcos M. Improvement in detecting cytomegalovirus drug resistance mutations in solid organ transplant recipients with suspected resistance using next generation sequencing. *PLoS One*. 2019 Jul 18;14(7):e0219701. doi: 10.1371/journal.pone.0219701. PMID: 31318908; PMCID: PMC6638921.

10. Cabrera R, Fernández-Barat L, Vázquez N, Alcaraz-Serrano V, Bueno-Freire L, Amaro R, **López-Aladid R**, Oscanoa P, Muñoz L, Vila J, Torres A. Resistance mechanisms and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with bronchiectasis. *J Antimicrob*

11. Calvo-Lozano O, Sierra M, Soler M, Estévez MC, Chiscano-Camón L, Ruiz-Sanmartin A, Ruiz-Rodríguez JC, Ferrer R, González-López JJ, Esperalba J, Fernández-Naval C, Bueno L, **López-Aladid R**, Torres A, Fernández-Barat L, Attoumani S, Charrel R, Coutard B, Lechuga LM. Label-Free Plasmonic Biosensor for Rapid, Quantitative, and Highly Sensitive COVID-19 Serology: Implementation and Clinical Validation. *Anal Chem.* 2022 Jan 18;94(2):975-984. doi: 10.1021/acs.analchem.1c03850. Epub 2021 Dec 31. PMID: 34971311; PMCID: PMC8751014.

ANEXO 4. Patente desarrollada en paralelo durante la realización de la tesis doctoral: patente de anticuerpo monoclonal anti-Sars-CoV-2.

La afectación de la COVID en mi tesis:

He redactado un proyecto bajo la tutela de la Dra. Fernandez-Barat en las becas COVID-19 de la Generalitat de Catalunya, dicho proyecto fue concedido y estamos en la etapa final de dicho proyecto. El proyecto se basa en la producción de anticuerpos monoclonales contra Sars-CoV-2 basándonos en muestras de serum de pacientes con bronquiectasias. Hemos realizado modelos predictivos de epítomos basados en proteínas de la superficie del virus así como un mapaje de epítomos para encontrar el mejor epítomo en la disposición espacial y reactividad enfrentándolo al serum de 500 pacientes recuperados de COVID-19. Hemos finalizado con éxito el proyecto COVID concedido por La Generalitat y BIOCAT obteniendo un anticuerpo monoclonal. Actualmente hemos producido el anticuerpo monoclonal contra Sars-CoV-2 que evade todas las Variants of Concern incluida Omicron, y que, actualmente esta en vías de patente.

A continuación se exponen los bloques de trabajo relacionados con este proyecto:

Bloc 1: Identificación de los epítomos *in silico*

Mediante las nuevas herramientas bioinformáticas de biología estructural, análisis bioquímicos y de modelos predictivos; se identificaron las regiones de la superficie del virus concretamente de la proteína Spike (dado que es el target de unión a la célula para infectar) potencialmente inmunogénicas por las células B. Desarrollamos un pipeline para

predecir los epítomos potenciales por la neutralización de anticuerpos. Este pipeline incluye predicciones lineales y estructurales de los epítomos teniendo en cuenta las interacciones y características químicas de los epítomos: glicosilaciones, localización del epítomo en la estructura 3D de la proteína, hidrofobicidad/hidrofiliidad, punto isoeléctrico, pH, puentes disulfuro y dominios proteicos donde cae cada epítomo.

Bloque 2: Identificación de los epítomos por la producción de anticuerpos monoclonales

Una vez definidos los epítomos más inmunogénicos in silico, se estudió la estrategia más adecuada para conjugar los péptidos en las beads magnéticas de la plataforma luminex para estudiar cuál de los candidatos tenía más inmunogenicidad contra el suero de 500 pacientes recuperados de COVID-19. La técnica de luminex se basa en los principios de un ELISA, pero permite multiplexar en un pozo diferentes targets. Nosotros multiplexamos en cada pozo todos los péptidos candidatos (n=27) para observar el que daba mayor fluorescencia.

Previo a lo experimental, se tuvo que diseñar la estrategia permitiendo que el péptido quedara expuesto y se puede conjugar en las beads magnéticas de luminex para hacer al experimental la lectura

de fluorescencia. La estrategia empleada en contra de lo que hemos leído en los papeles fue conjugar una Biotina-PG12-Péptido para unir la biotina en la avidina de las beads magnéticas. En los papeles siempre se habla de mínimo PEG 17 para arriba, nosotros optamos por una PEG12 lo que no es habitual en este tipo de "couplings". Parecía que era un biopolímero demasiado corto para separar a los péptidos de las beads pero en el resultado de la validación se observó una eficaz adherencia del constructo con las beads.

Esta estrategia novedosa demuestra que una PEG12 es suficiente para realizar mapeos de epítomos lineales con suficiente espacio para que se acoplen bien a las beads y reaccionen de forma correcta con los anticuerpos de los pacientes recuperados. Una vez hechas todas las validaciones de acoplamiento, multiplexación y de los cut-off basados en controles negativos pre-pandemia procedimos a realizar las pruebas piloto con 40 positivos y 40 negativos pre-pandemia (COVID-19 negativos).

Fue un éxito y se decidió proceder a realizar el estudio con 500 muestras. Con las 500 muestras se observaron eficacias del 91% en algunos epítomos candidatos. Con esta información decidimos hacer la producción de anticuerpos monoclonales basados en las regiones candidatas de mayor inmunogenicidad.

Esta producción se decidió hacer con la tecnología phage display, debido a la necesidad de tener anticuerpos humanizados lo más rápido posible por la pandemia. Con los hibridomas deberían haberse humanizado los anticuerpos y esto hubiera retrasado los timings para obtener una nueva opción terapéutica contra SARS-CoV-2, por este motivo se decidió hacer phage display con una empresa líder mundial en la producción de monoclonales mediante el phage display. Finalmente con los anticuerpos monoclonales producidos se cristalizarán por Raigos X en el PCB. La finalidad es la confirmación mediante modelos estructurales in silico de los puntos de unión de este anticuerpo monoclonal en la proteína spike. Una vez hecha la confirmación se estudiarán in silico todas las variantes de la proteína spike para observar si nuestros anticuerpos reaccionan contra todas las variantes actuales.

Con los hibridomas deberían haberse humanizado los anticuerpos y esto hubiera retrasado los timings para obtener una nueva opción terapéutica contra SARS-CoV-2, por este motivo se decidió hacer phage display con una empresa líder mundial en la producción de monoclonales mediante el phage display. Finalmente con los anticuerpos monoclonales producidos se cristalizarán por Raigos X en el PCB. La finalidad es la confirmación mediante modelos estructurales in silico de los puntos de unión de este anticuerpo monoclonal en la proteína spike. Una vez hecha la confirmación se estudiarán in silico todas las variantes de la proteína spike para observar si nuestros anticuerpos reaccionan contra todas las variantes actuales.

Bloc 3: Identificación de los epítomos para la producción de anticuerpos monoclonales mediante phage display con 10⁹ clones de anticuerpos anti-SARS-CoV-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras recogidas

Se reclutó prospectivamente un tamaño de muestra de 509 pacientes recuperados por COVID-19 después de 30-40 días después del inicio de los síntomas, PCR positiva o alta hospitalaria/UCI. La presencia de IgG contra SARS-CoV-2 se confirmó mediante inmunoensayos de flujo lateral en todos los participantes del estudio. En las visitas de pacientes basadas en manifestaciones clínicas durante la enfermedad de la COVID-19 evaluamos la gravedad en cuatro grupos: Asintomático, leve, moderado y grave.

Las muestras se enviaron al Biobanco IDIBAPS para su registro y almacenamiento hasta el inicio de la parte experimental. Esta parte experimental se llevó a cabo en los laboratorios Isglobal en

los que realizamos la estrategia para detectar niveles de distintos epítomos candidatos mediante el instrumento Luminex FlexMap (LUMINEX CORP, CA).

Modelos predictivos in silico

En este proyecto hemos desarrollado un pipeline computacional para predecir los epítomos virales con mayor probabilidad de ser reconocidos mediante anticuerpos neutralizantes. Nuestro pipeline incluye tanto predicciones de epítomos lineales como estructurales, que después se priorizan según múltiples variables que influyen en la interacción entre los anticuerpos y sus epítomos: estado de glicosilación, localización en la membrana viral y accesibilidad en la conformación 3D de la su proteína parental, hidrofobicidad, hidrofiliidad, punto isoeléctrico, puentes disulfo presentes en secuencias y su homología con otras proteínas mediante modelos de alineación y predicción estructural. Además, hemos desarrollado un conjunto de herramientas bioinformáticas para gestionar y filtrar los epítomos predichos a la vez que aumentamos el gasoducto para hacer posible una predicción completa del epítom del proteoma SARS-CoV-2. Después hemos sintetizado péptidos que abarcan múltiples epítomos y hemos utilizado estos péptidos para identificar anticuerpos monoclonales en el suero de pacientes recuperados por COVID19. Se incluyeron predicciones de epítomos lineales y estructurales, teniendo en cuenta los factores que influyen en su unión a los anticuerpos: estado de glicosilación, localización en la membrana viral y accesibilidad a la conformación 3D.

Mapeo de epítomos

El mapeo de epítomos se realizó mediante la tecnología Luminex (Luminex Corp. EEUU) para seleccionar aquellos epítomos con la reactividad de IgG más alta (medida por la intensidad de fluorescencia media-MFI) en las muestras de suero convaleciente. Para realizar el mapeo del epítom, era necesario realizar un método de ensamblaje para cuentas de luminex conjugados con cada péptido predictivo. (ensamblado citado)

Los límites de seropositividad para cada péptido se calcularon mediante un conjunto de 126 controles negativos (NC). (1, 2).

El ensayo consistió en 27 antígenos diferentes, cada uno ensamblado de forma covalente a un conjunto de perlas Luminex único mediante protocolos de acoplamiento estándar. Las perlas se conjugaron mediante un procedimiento de ensamblaje de perlas XMAP Avidin según las instrucciones del fabricante (LUMINEX Corp.). Brevemente, se sonicaron 1 ml de perlas ($1,25 \times 10^6$ /ml) durante 20 segundos y después se lavaron las perlas y se volvieron a suspender en 500 μ L de tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 4, 8 (tampón de activación) seguido de 15 segundos de vortex y 15 segundos de sonicación. . Las perlas se lavaron 3 veces con tampón de activación, se volvieron a suspender en 250 μ L de 5 μ g/ μ l de cada péptido recién preparado y se incubaron en un rotador durante 30 min en RT protegido de la luz. A continuación, se lavaron las perlas y se volvieron a suspender en 500 μ L de PBS x3 veces y el acoplamiento volvió a suspenderse en 250 μ l de tampón de acoplamiento. Por último, las perlas se almacenaron protegidas de la luz a 4 ° C hasta el inicio del ensayo. Los anticuerpos para el mapeo de epítomos se incubaron con la

mezcla de perlas durante la noche con shaker a 4°C. Al día siguiente se lavaron las placas y, posteriormente, se incubaron con IgG anti-ratón marcada con PE incubando anticuerpos secundarios 30 min en RT. Cada placa contiene una curva estándar y controles en blanco, además de controles negativos de prepandemia para comprobar la eficacia del experimento y el establecimiento de cortes respectivamente. Las perlas de epítipo conjugados se analizaron en un instrumento FlexMap Luminex (LUMINEX CORP, CA).

El valor de corte establecido en los inmunoensayos enzimáticos ha sido durante mucho tiempo una preocupación (Ridge y Vizard 1993). Por lo general, y especialmente con los valores de corte hechos en casa, se estiman utilizando sueros negativos independientes conocidos (a veces junto con positivos) que se incluyen en las placas de título entre las muestras desconocidas. Una fórmula general para un valor de corte es la media y SD la desviación estándar de las lecturas de control negativo independiente, (es decir, corte = media + 3 veces la desviación estándar) (Classen et al. 1987).

$$Cutoff = a.\bar{X} + f. SD (1)$$

Por último, construimos gráficos para observar el % de muestras positivas de pacientes recuperados de cóvid-19 hasta el corte de cada epítipo, para mostrar qué epítipo era el más inmunogénico analizando los niveles de fluorescencia obtenidos con el instrumento LUMINEX FlexMap.

RESULTADOS

In silico predicciones: Nuestros candidatos finales eran extracelulares, no glicosilados y accesibles mejorando su capacidad de ser reconocidos mediante anticuerpos neutralizantes. Para combinar epítopos superpuestos en regiones de epítopos y generar un consenso entre predictores de epítopos de células B, hemos diseñado Epiconsensus, una herramienta que no sólo fusiona epítopos superpuestos, sino que también puntúa a las regiones epítopas resultantes con los siguientes criterios de ordenación entre predictores: primero, ordenado por la mejor puntuación de Bepipred 2.0; segundo, ordenado por la mejor puntuación de Discotope 2.0 y tercero, ordenado por la mejor puntuación ABCpred. El resultado fueron 27 epítopos potencialmente inmunogénicos.

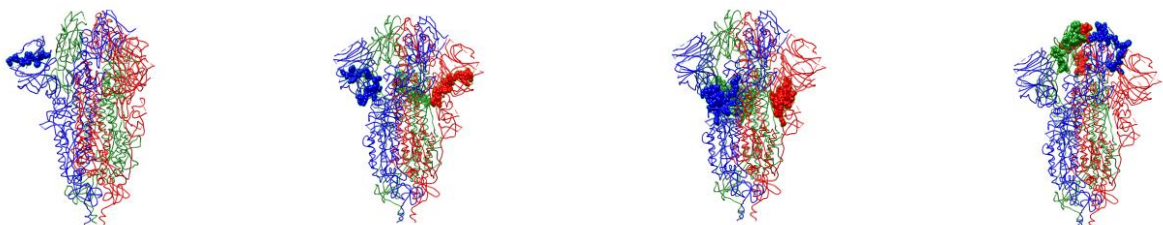


Figura 1. Accesibilidad de los epítomos candidatos en la conformación tridimensional de la proteína Spike.

Pruebas de multiplexación: Se compararon a diferentes diluciones las MFIs entre el Singleplex y el multiplex y se observó que las MFIs no varían cuando se multiplexa así que se decidió multiplexar el mapeo de epítomos para dar robustez a las señales de cada epítomo y evitar los errores crasos.

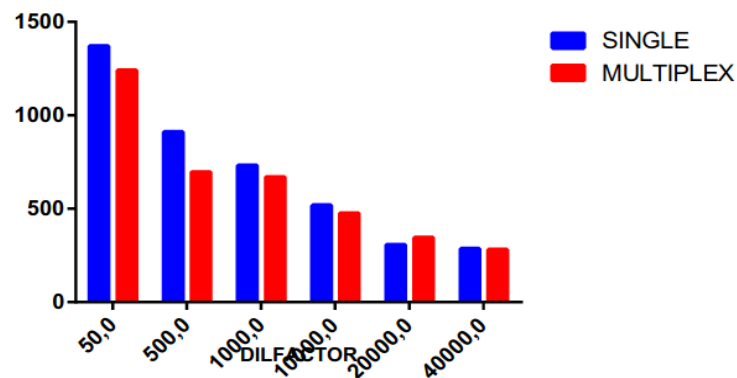


Figura 2. Grafica de Single plex VS multiplex para observar las MFIs entre Single y multiplex.

Detección de validación: nuestro pipeline predijo veintisiete epítomos de SARS-CoV-2 S que se incluyeron en el panel Luminex. Cuarenta muestras de suero/plasma de convalecientes COVID-19. Se incluyeron pacientes y 126 NC pre-pandemia en el mapa del epítomo de validación. Ocho epítomos se seleccionaron MFIs más altas para el mapeo del epítomo.

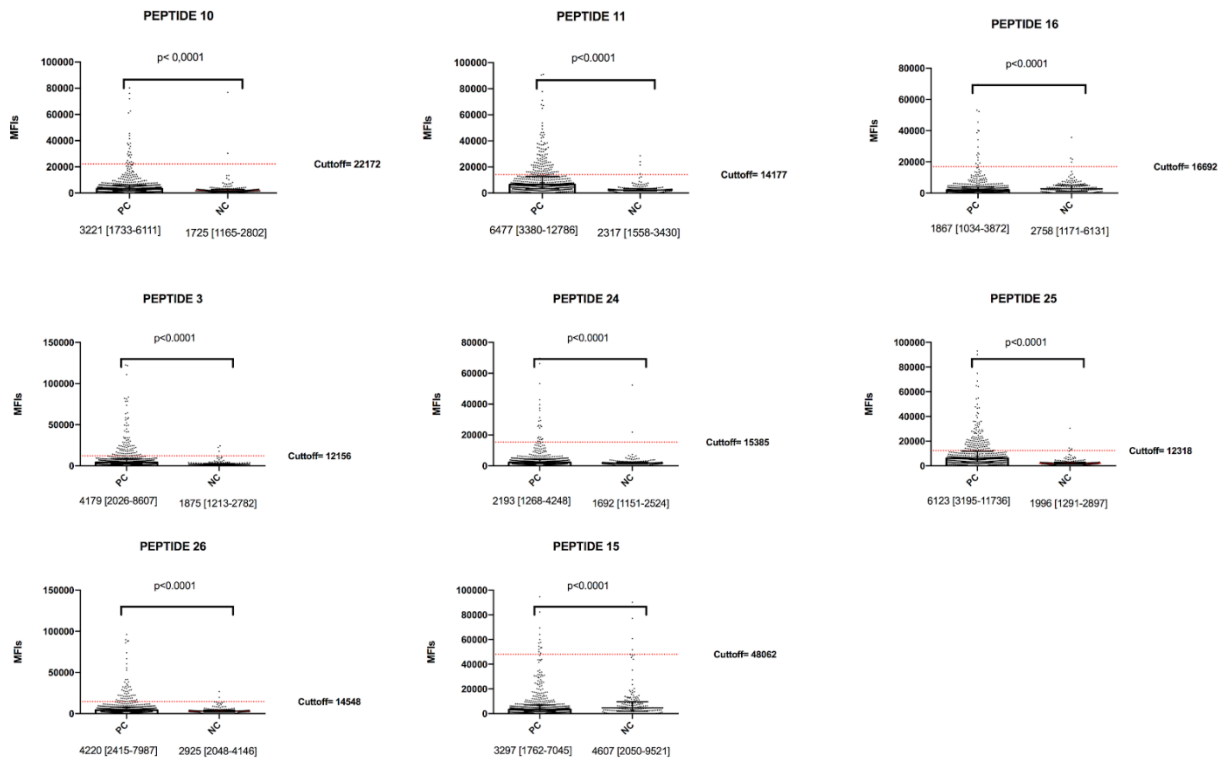


Figura 3. Epitope mapping con las MFIs más elevadas por encima del cutoff.

Mapeo de epítomos: se probaron quinientas nueve muestras de suero con 8 epítomos obtenidos cribado de validación. Los dos epítomos con las MFIs más altas y los porcentajes más altos de pacientes Se seleccionaron (39% y 33%) por encima de los límites.

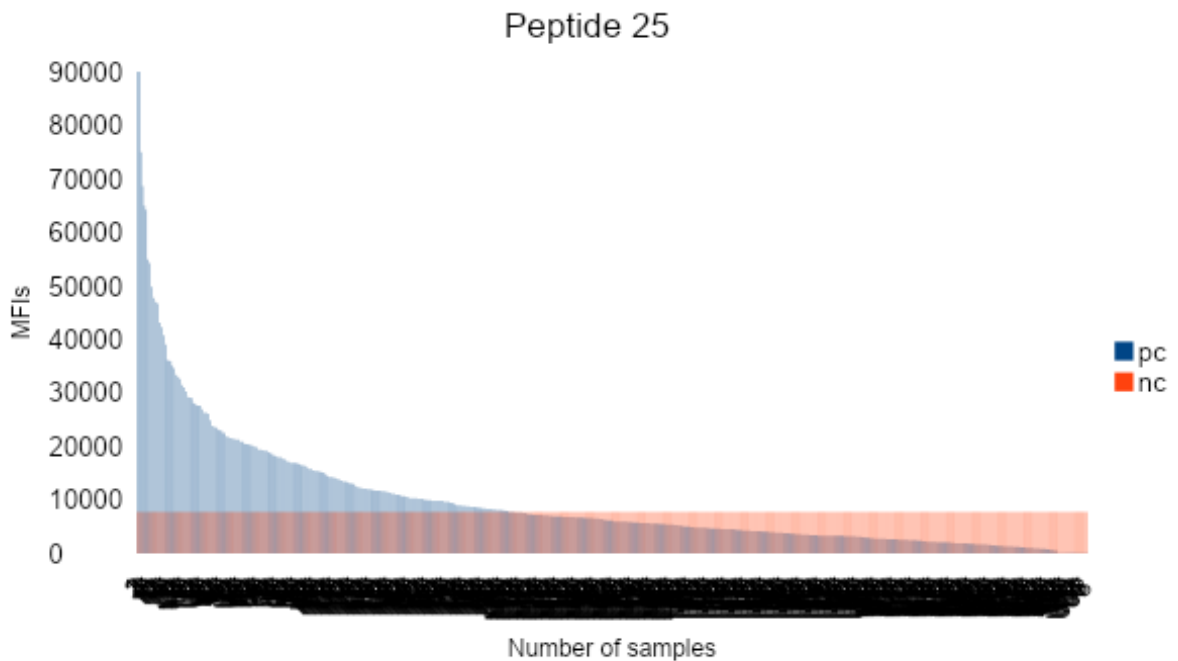


Figura 4. MFI por encima del cut-off = 39,25%. Cutoff=7723,85 MFIs

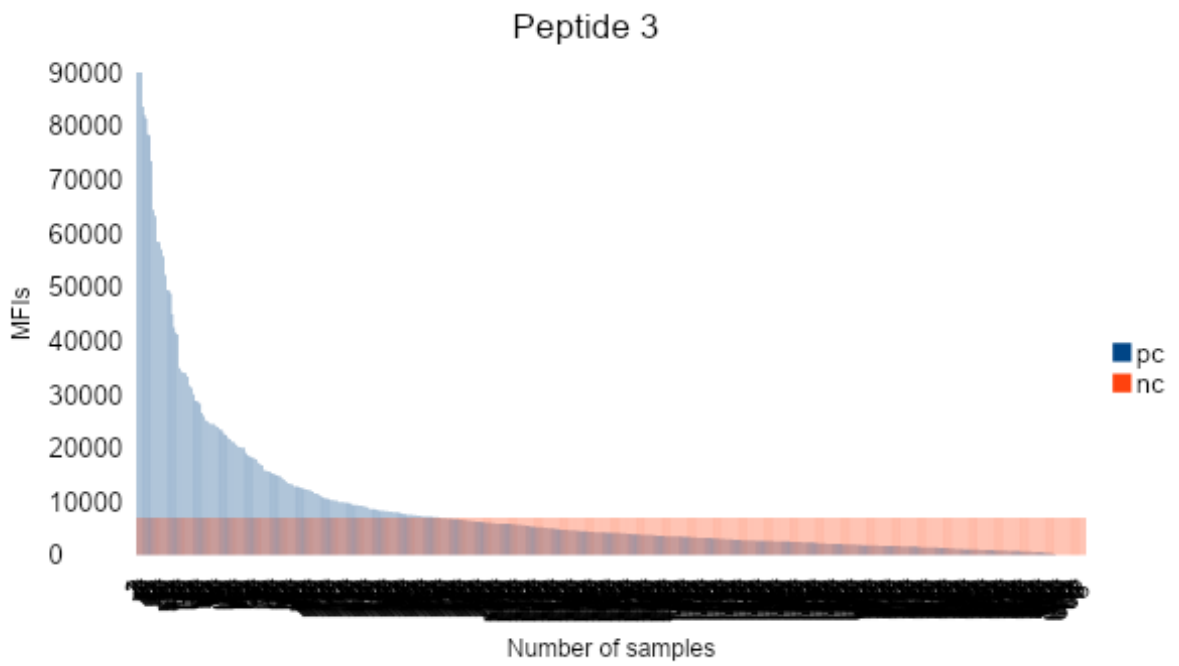


Figura 5. MFI por encima del cut-off = 31,75%. Cutoff=7002,30 MFIs

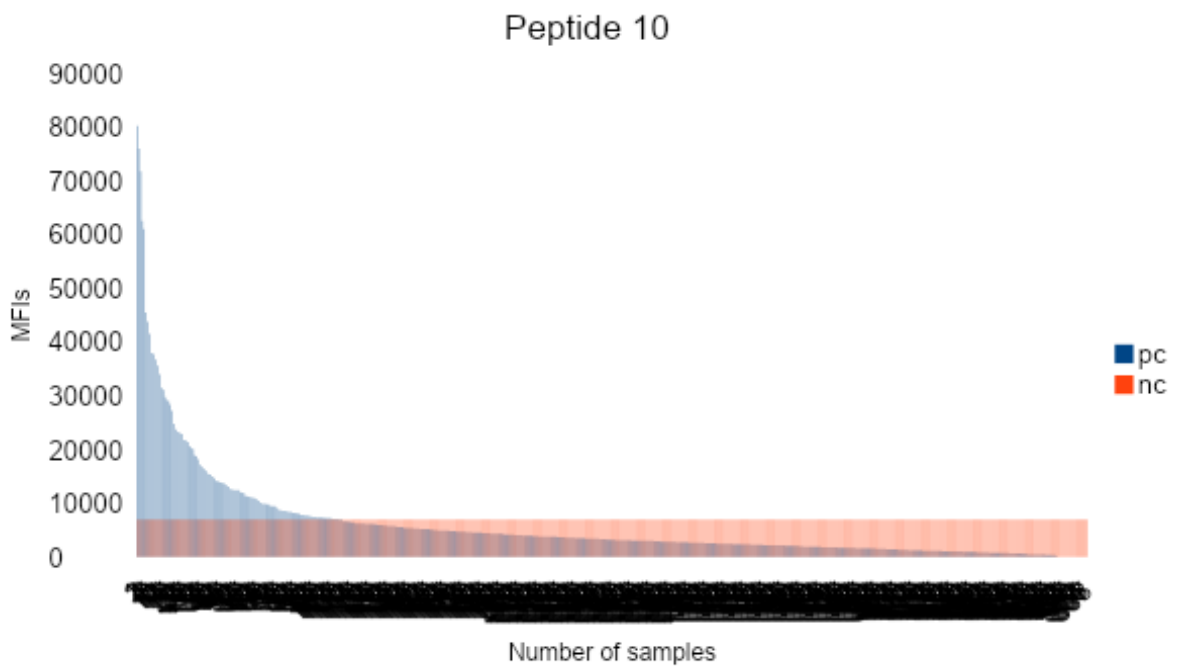


Figura 6. MFI por encima del cut-off = 21,50%. Cutoff=6986,69 MFIs

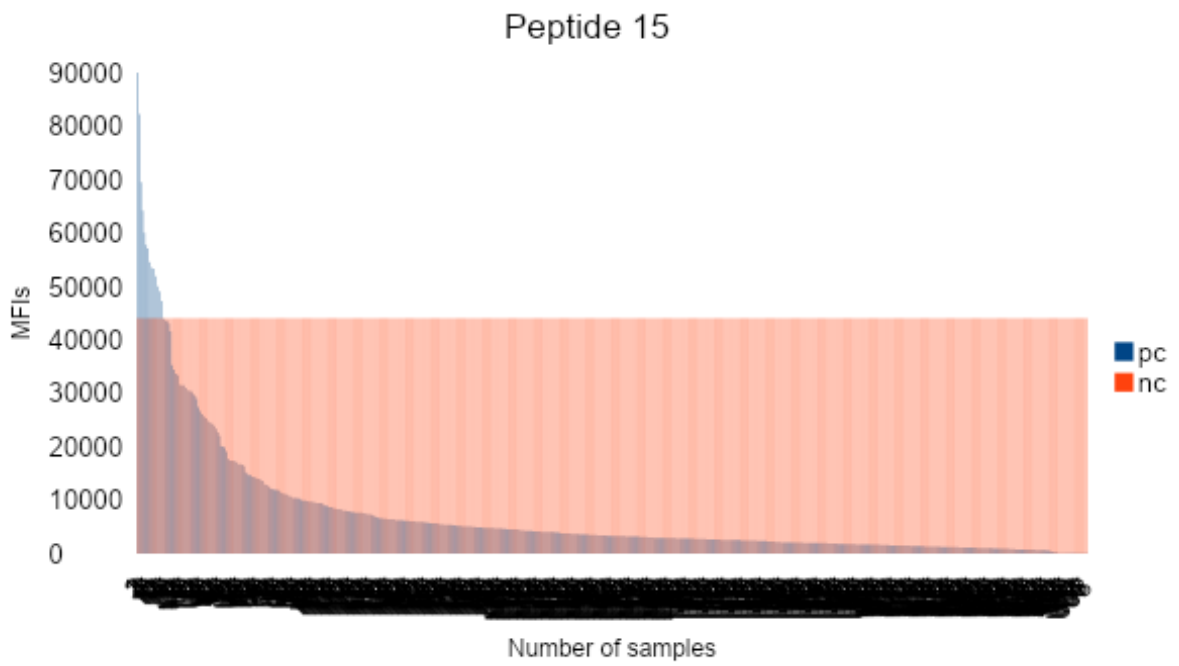


Figura 7. MFI por encima del cut-off = 2,56%. Cutoff=44014,61 MFIs

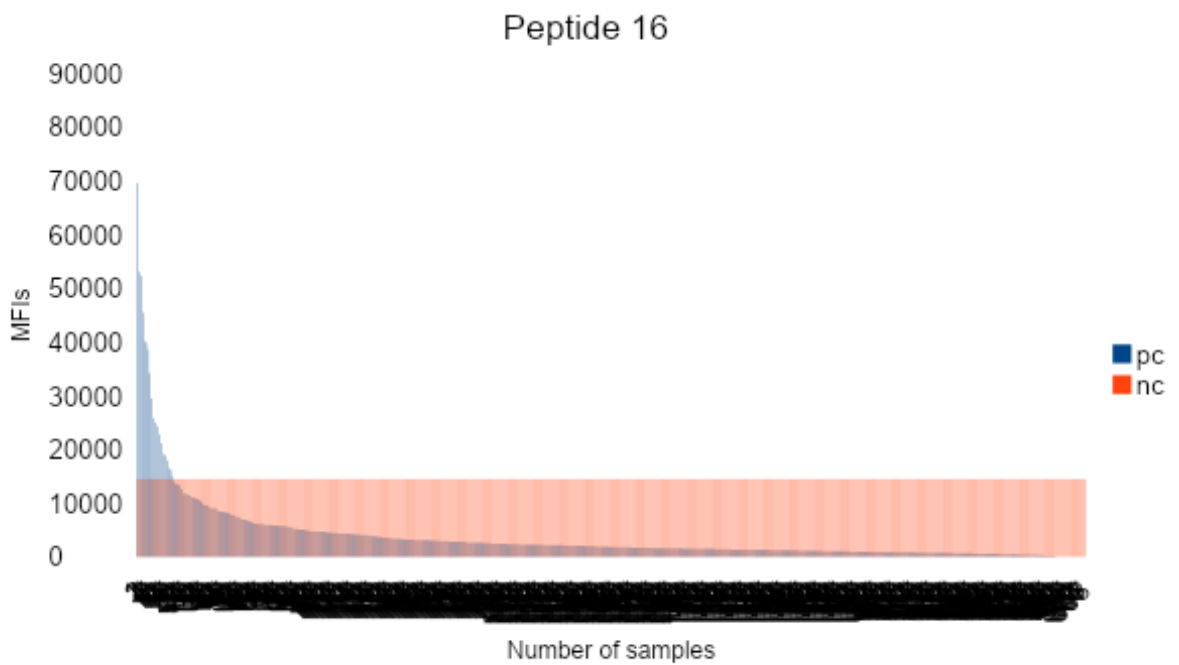


Figura 8. MFI por encima del cut-off = 3,55%. Cutoff=14496,13 MFIs

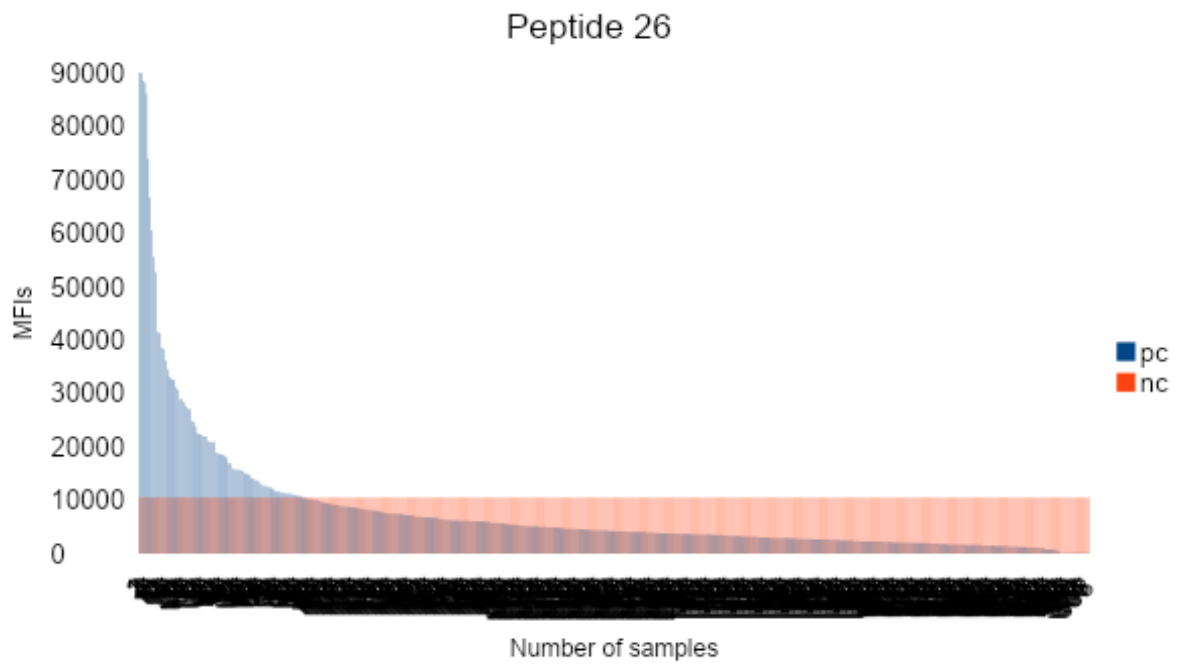


Figura 9. MFI por encima del cut-off = 17,15%. Cutoff=10522,26 MFIs

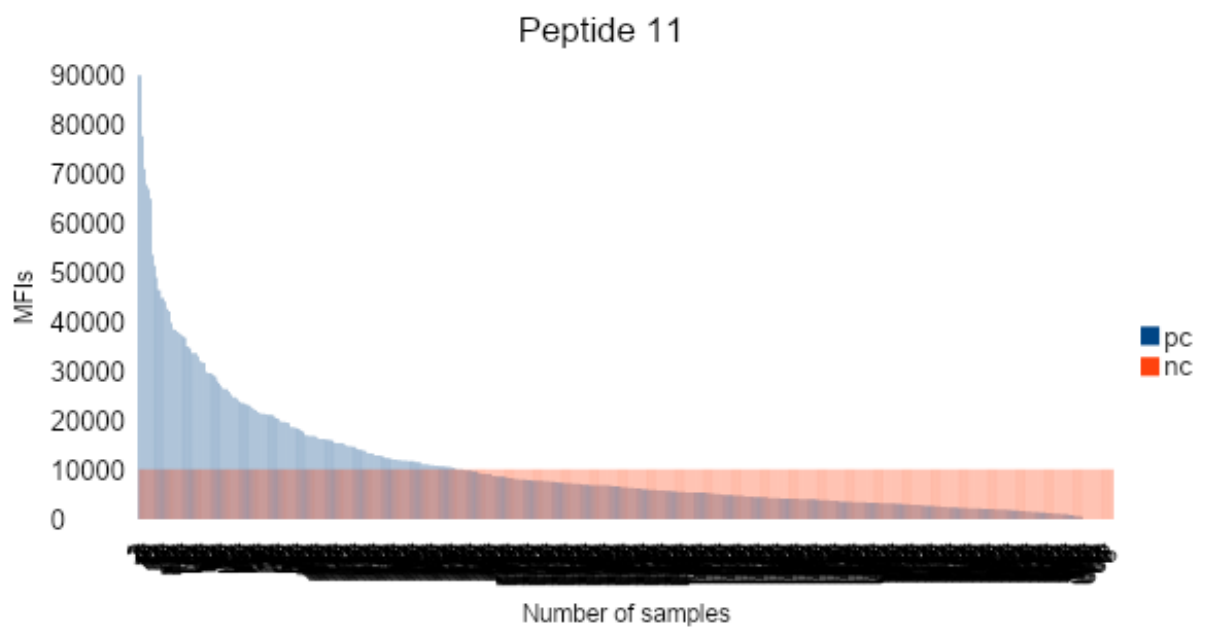


Figura 10. MFI por encima del cut-off = 33,13%. Cutoff=10144,87 MFIs

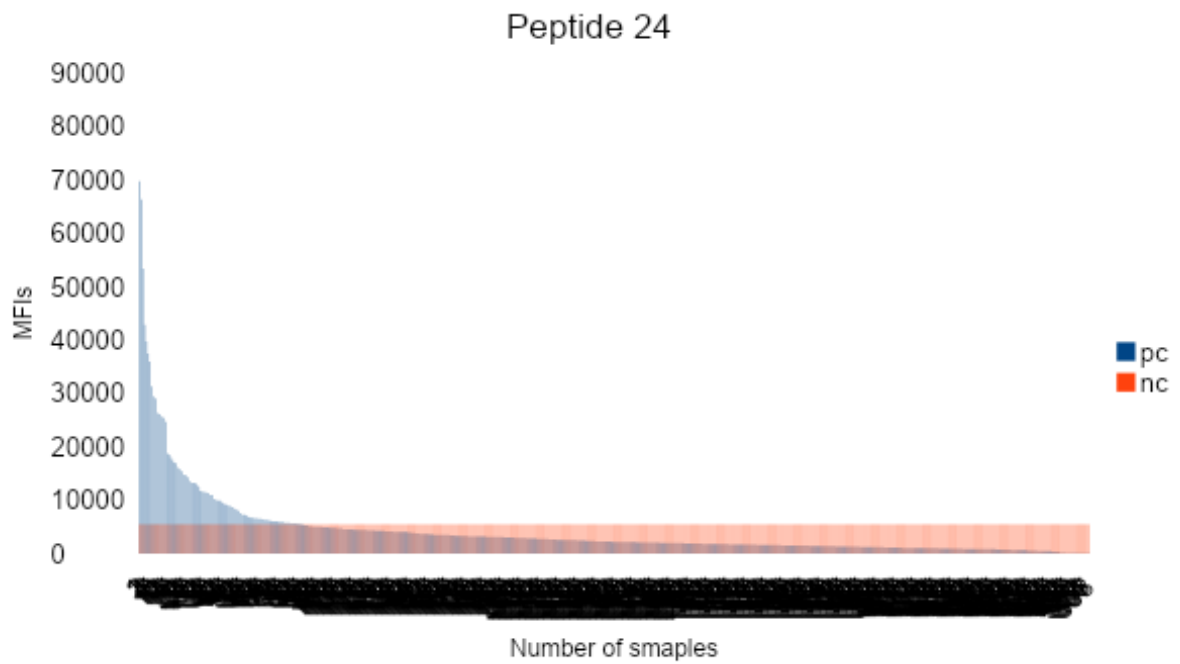


Figura 11. MFI por encima del cut-off = 16,76%. Cutoff=5502,64 MFIs

Cribado de visualización de fagos: los dos mejores epítomos se examinaron en la biblioteca de fagos que contenía 10^9 clones de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 para producir mAbs mediante tecnología de fagos. El servicio fue contratado con proteogenix, empresa líder a nivel de producción de anticuerpos monoclonales mediante phage display.

