



Editorial

Mirar el bosque y no el árbol: el microbioma en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la fibrosis quística

Look at the wood and not at the tree: The Microbiome in Chronic Obstructive Lung Disease and Cystic Fibrosis

Eduard Monsó

Servicio de Neumología, Hospital Universitari Parc Taulí, Ciber de Enfermedades Respiratorias-Ciberes, Barcelona, España



Secuenciación del microbioma humano

Las técnicas microbiológicas basadas en el cultivo actualmente disponibles no son adecuadas para la identificación de hasta un 80% de los microorganismos que habitan en las superficies mucosas, ya que una buena parte de las bacterias que forman parte del microbioma humano son difíciles de cultivar por métodos convencionales y a menudo el cultivo ofrece resultados falsamente negativos en presencia de flora anaerobia obligada o cuando las cargas bacterianas son bajas. La secuenciación del gen que codifica el componente 16S del ARN ribosómico (*16SrRNA*) después de amplificación ha llevado el estudio de la diversidad microbiana a un elevado nivel de detalle, tipificando la presencia bacteriana en su conjunto hasta el nivel de género, y en muchos casos incluso de especie, independientemente de los resultados obtenidos en el cultivo.

Microbioma respiratorio

En el aparato respiratorio la aplicación de técnicas independientes del cultivo demostró ya desde un principio que en el sujeto normal el árbol bronquial no es estéril, y que en ausencia de enfermedad respiratoria aloja una flora microbiana que presenta una gran similitud con la orofaríngea, por migración de esta al árbol bronquial. El estudio del microbioma alojado en los diversos compartimientos del aparato respiratorio ha permitido descartar que la flora bronquial que se recupera de esputo y se identifica en la secuenciación sea atribuible a contaminación por la flora orofaríngea, y ha objetivado que las similitudes del microbioma broncopulmonar y el orofaríngeo son determinadas por la migración de la flora supraglótica hacia el árbol traqueobronquial, con una homogeneidad superior entre ambas composiciones bacterianas cuando el área bronquial examinada es más próxima a la orofaringe, como es el caso del lóbulo superior derecho¹. La migración bacteriana de orofaringe a árbol traqueobronquial se ve

facilitada por la microaspiración, un fenómeno que aparece periódicamente durante la noche con una frecuencia variable¹. Esta flora de continuidad con la orofaringe es posteriormente modulada por el microambiente del espacio broncopulmonar, que favorece el crecimiento de algunos de los componentes de la flora². Esta modificación se magnifica cuando existe enfermedad pulmonar crónica (EPOC), situación en la que la flora traqueobronquial se diferencia claramente de la orofaríngea³.

Enfermedad estable

En la EPOC, el análisis del microbioma respiratorio ha permitido objetivar una disminución de la diversidad bacteriana en el árbol traqueobronquial cuando la enfermedad se agrava, lo que resulta identificable a través del descenso en el Shannon Diversity Index, un marcador que reconoce tanto la disminución en los tipos bacterianos presentes como su pérdida de abundancia. Esta anomalía es atribuible fundamentalmente a una disminución en la flora anaerobia, sobre todo en los géneros *Prevotella* y *Veillonella*, que se ven parcialmente sustituidos por proteobacterias como *Haemophilus* o *Pseudomonas*, géneros que incluyen patógenos respiratorios comunes que llegan a ser una parte dominante de la flora alojada en el árbol respiratorio en estos pacientes^{4,5}. El mismo patrón se ha objetivado en la fibrosis quística, en la que se ha relacionado también con el consumo recurrente de antibióticos⁶.

Exacerbación

Aunque en la exacerbación de la EPOC la flora respiratoria en su conjunto solo se modifica en la mitad de los casos⁴, la abundancia relativa de géneros que incluyen patógenos respiratorios específicos se incrementa significativamente respecto a muestras previas obtenidas de los mismos pacientes en situación de estabilidad^{4,7}. La sensibilidad del cultivo bacteriano convencional para la identificación del agente causal de una exacerbación tiene limitaciones en la EPOC. Aunque en más del 70% de los episodios un patógeno identificado en la secuenciación aumenta su abundancia relativa respecto a la estabilidad y alcanza una dominancia superior al 50% en la muestra del paciente⁷, este microorganismo no es identificado

 Correo electrónico: emonso@tauli.cat

en el cultivo en cerca de la mitad de las exacerbaciones^{8,9}, una limitación que también ha sido identificada en la fibrosis quística^{10,11}. El análisis del microbioma respiratorio en la EPOC ha objetivado que microorganismos potencialmente patógenos como *Moraxella catarrhalis* son causales de la exacerbación en más de una tercera parte de los casos, al objetivar que el género *Moraxella* muestra abundancias relativas claramente superiores a las observadas en los mismos pacientes en el período previo de estabilidad^{4,7}.

Cultivo y microbioma

El hallazgo de cultivos positivos para *Pseudomonas aeruginosa* en la EPOC y la fibrosis quística plantea problemas específicos cuando se analiza a la vista de los resultados obtenidos en el análisis del microbioma de la muestra respiratoria estudiada. Diversos estudios han mostrado una buena correlación entre la abundancia relativa del género *Pseudomonas* en la secuenciación y la cuantificación de *Pseudomonas aeruginosa* en el cultivo^{7,8,12} y tanto la secuenciación como el cultivo se han mostrado útiles para identificar la colonización crónica por este microorganismo cuando sus aislamientos se mantienen en el tiempo¹³. En una exacerbación que aparece en un paciente crónicamente colonizado, sin embargo, el hallazgo de cultivos positivos para *Pseudomonas aeruginosa* puede resultar equívoco, ya que ocasionalmente identifica el colonizante, y no el causante de la exacerbación. Esta es la situación en una quinta parte de los episodios de empeoramiento en pacientes colonizados por este microorganismo, en los que la secuenciación identifica un microorganismo causal del episodio agudo distinto de *Pseudomonas aeruginosa*, aunque este patógeno aparezca en el cultivo^{8,9}.

Espujo y lavado broncoalveolar

En las enfermedades respiratorias plantea dificultades el elegir la muestra más adecuada para el análisis del microbioma respiratorio. Sin duda el espujo, espontáneo o inducido, es la muestra más fácilmente obtenible, aunque solo es representativa de la vía respiratoria bronquial¹⁴. El lavado broncoalveolar genera resultados equivalentes al cepillado bronquial distal obtenido en condiciones de esterilidad². La ventaja relativa del lavado (su capacidad de muestrear un volumen amplio que se extiende al sector alveolar) se ve contrarrestada por el efecto de dilución de la técnica, que limita la validez de los resultados obtenidos. Las situaciones de muestreo en las que el material obtenido contiene una menor cantidad de biomasa debido a dilución, como es el caso del lavado broncoalveolar, reducen el número de copias del gen *16SrRNA* presentes¹, lo que determina que la frecuente existencia de contaminantes bacterianos en el procesado, presentes en los mismos reactivos utilizados en concentraciones muy bajas, queden magnificados en el recuento de la abundancia relativa, al contraponerse a una cantidad escasa de material de origen bacteriano, lo que dificulta la interpretación de los resultados obtenidos¹⁵. Así, el análisis del microbioma en muestras respiratorias, y especialmente en el lavado broncoalveolar, requiere de la utilización de controles en los que se haya seguido el mismo proceso analítico y que, por lo tanto, contengan los contaminantes propios del procesado, para descartar de las lecturas finales obtenidas en la muestra objeto de estudio los tipos bacterianos presentes en las muestras control.

Por lo tanto, el análisis del microbioma respiratorio nos ha permitido confirmar la abundante flora microbiana alojada en el árbol traqueobronquial y su diversidad, junto con los cambios en ella que se asocian a la aparición de una enfermedad crónica y de sus exacerbaciones. Así, actualmente ya resulta evidente que los cambios en la carga bacteriana de un microorganismo no son el único elemento fundamental en la evolución microbiológica de una determinada enfermedad, y que estas alteraciones puntuales deben ser interpretadas solo como un componente de los cambios que aparecen en el conjunto de la flora microbiana, cuya interacción es determinante. El árbol solo es una parte del bosque.

Financiación

Este texto se ha realizado en parte con ayudas de FIS PI15/00167, FIS PI18/00934 y Fundacions BRN/Plà Armengol con ayudas del Instituto de Salud Carlos III, España (FIS PI15/00167 y FIS PI16/00934; y de Fundacions BRN/Plà Armengol, España (2015).

Bibliografía

1. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio*. 2015;6, <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00037-15>, e00037.
2. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12:821-30.
3. Armougom F, Bittar F, Stremmer N, Rolain JM, Robert C, Dubus JC, et al. Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28:1151-4.
4. Mayhew D, Devos N, Lambert C, Brown JR, Clarke SC, Kim VL, et al. Longitudinal profiling of the lung microbiome in the AERIS study demonstrates repeatability of bacterial and eosinophilic COPD exacerbations. *Thorax*. 2018;73:422-30.
5. Einarsson GG, Comer DM, McIlreavey L, Parkhill J, Ennis M, Tunney MM, et al. Community dynamics and the lower airway microbiota in stable chronic obstructive pulmonary disease, smokers and healthy non-smokers. *Thorax*. 2016;71:795-803.
6. Carmody LA, Caverly LJ, Foster BK, Rogers MA, Kalikin LM, Simon RH, et al. Fluctuations in airway bacterial communities associated with clinical states and disease stages in cystic fibrosis. *PloSOne*. 2018;13, e0194060.
7. Wang Z, Bafadhel M, Haldar K, Spivak A, Mayhew D, Miller BE, et al. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *Eur Respir J*. 2016;47:1034-6.
8. García-Núñez M, Martí S, Puig C, Pérez-Brocal V, Millares L, Santos S, et al. Bronchial microbiome, PQA biofilm-forming capacity and exacerbation in severe COPD patients colonized by *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol*. 2017;12:379-92.
9. Millares L, Ferrari R, Gallego M, García-Núñez M, Pérez-Brocal V, Espasa M, et al. Bronchial microbiome of severe COPD patients colonized by *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:1101-11.
10. Boutin S, Graeber SY, Weitnauer M, Panitz J, Stahl M, Clausnitzer D, et al. Comparison of microbiomes from different niches of upper and lower airways in children and adolescents with cystic fibrosis. *PloSOne*. 2015;10, e0116029.
11. Mahboubi MA, Carmody LA, Foster BK, Kalikin LM, van Devander DR, LiPuma JJ. Culture-based and culture-independent bacteriological analysis of cystic fibrosis respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 2016;54:613-9.
12. Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF, Stuart Elborn J, Boucher RC, Tunney MM, et al. The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PLoS ONE*. 2012;7:e45001.
13. Doring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Holby N, Smyth A, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: A European consensus. *Eur Respir J*. 2000;16:749-67.
14. Cabrera-Rubio R, García-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3562-8.
15. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffat MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*. 2014;12:87.