

VALORACIÓN METAGENÓMICA DE LA MICROBIOTA DE ESPUTO DE PACIENTES CON BRONQUIECTASIAS CRÓNICAS: EPOC vs FIBROSIS QUISTICA.

I Martín-Garrido (1), V. Friaza (2), R. Terán (1), MT. Martínez-Risquez (1), C. de la Horra (2), G. Ayala (3), L. Maíz (4), R. del Campo (3), Calderón E (2).

*1-Servicio de Medicina Interna. 2-CIBER de Epidemiología y Salud Pública Hospital Virgen del Rocío. Sevilla.
3- Servicio de Microbiología, 4-Unidad de Fibrosis Quística Hospital Ramón y Cajal. Madrid.*

ciberesp



Hospital Universitario
Ramón y Cajal
Comunidad de Madrid



HOSPITALES UNIVERSITARIOS
Virgen del Rocío

Introducción

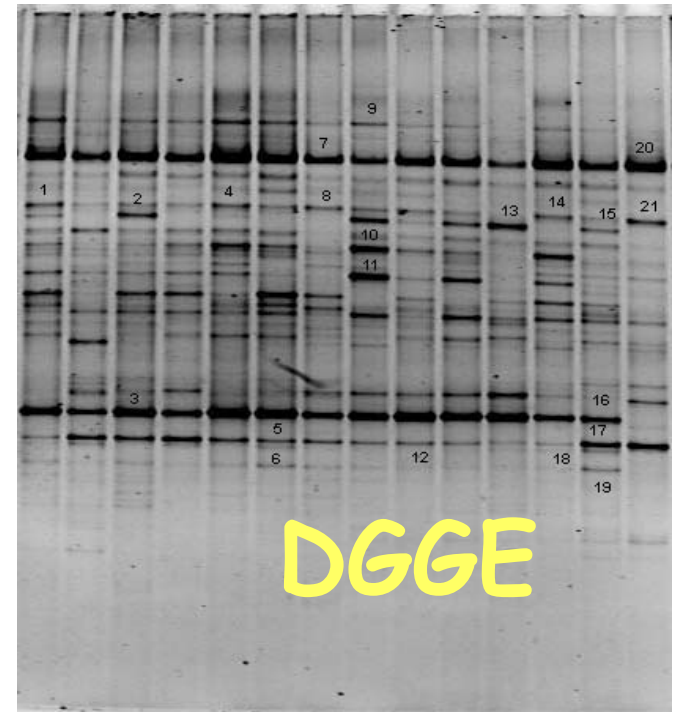
- El método de cultivo microbiano se considera el "patrón oro" para la detección de la colonización bacteriana en las bronquiectasias, tanto de enfermos con EPOC como de enfermos con Fibrosis Quística.
- Así mismo este método permite recuperar únicamente un pequeño número de agentes patógenos en una muestra, pero sabemos de antemano que existe un elevado número de patógenos que son difíciles de cultivar y por lo tanto no se identifican.
- Aunque no se conoce con claridad la flora patógenos en las bronquiectasias, probablemente jueguen un papel importante en la fisiopatología de estas enfermedades.

Introducción

- Metagenómica es un campo nuevo que combina la biología molecular y la genética en un intento de identificar y caracterizar el material genético de diferentes ambientes
- De esta forma, permiten la detección e identificación de microorganismos que no son cultivables por métodos convencionales.
- Teniendo en cuenta el mundo de las bacterias, los genes que codifican el 16S ARNr de la subunidad 30S ribosomal son excelentes marcadores filogenéticos para la identificación de las especies en general.

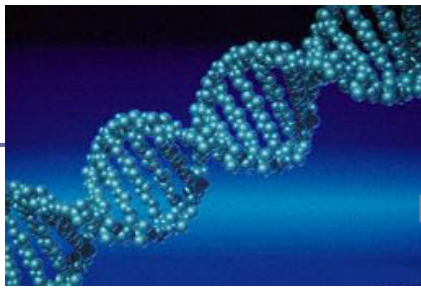
Introducción

- La desnaturalización mediante electroforesis en gel de gradiente (DGGE) , es una técnica que combina la amplificación por PCR con una posterior electroforesis del producto de PCR en geles verticales en un gradiente desnaturalizante
- Permite la visualización de hasta 1% de los cambios dinámicos en las comunidades bacterianas

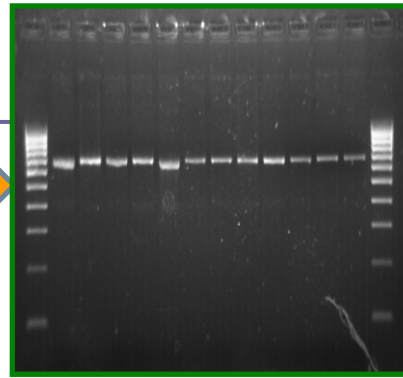


Material y métodos

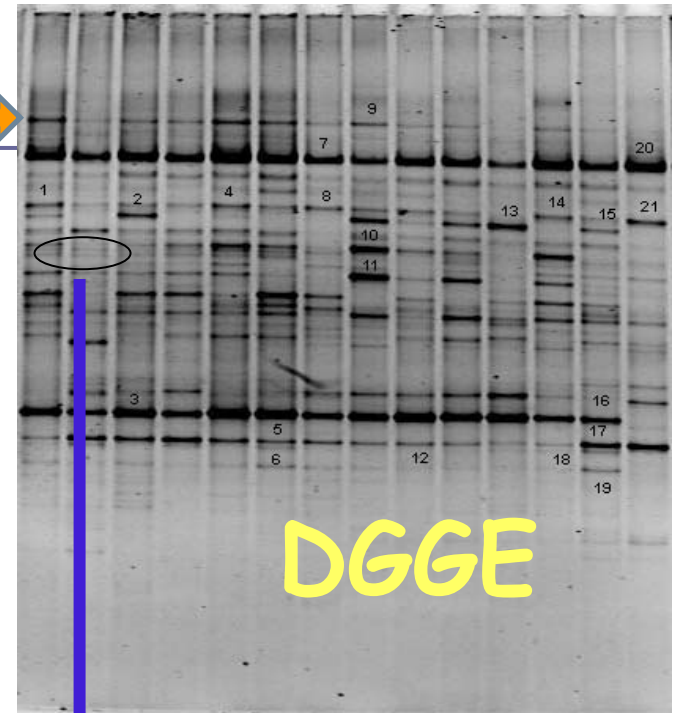
- Se recogieron muestras de esputo procedentes de 15 pacientes con FQ y 15 pacientes con bronquiectasias y EPOC
- El DNA de las muestras fue extraído con el kit NucleoSpin Tissue (MN) siguiendo las especificaciones del fabricante.
- La PCR-DGGE fue llevada a cabo a partir de 100 ng de DNA total empleando primers para la región conservada de RNA ribosómico 16S.
- Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis vertical a 60°C en geles de poliacrilamida al 8% y con un gradiente de urea-formamida del 35 al 50%.
- Las bandas obtenidas se cortaron y el DNA fue purificado y reamplificado para su posterior secuenciación e identificación
- Las similitudes entre los patrones de bandas fueron analizadas con el software Phoretix 5.0 y se construyeron los dendogramas en base al coeficiente Dice



**Total DNA
Microbioma**



**PCR 16S RNA
Universal primers**



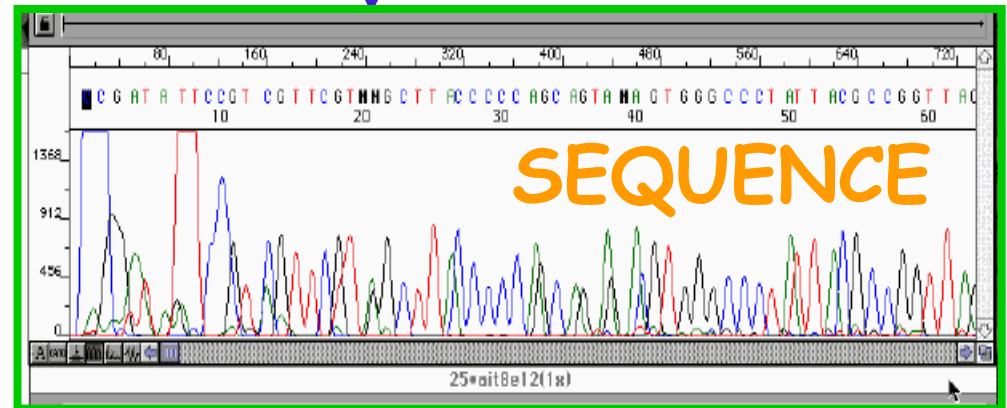
DGGE

**BACTERIAL
IDENTIFICATION**

genera/specie

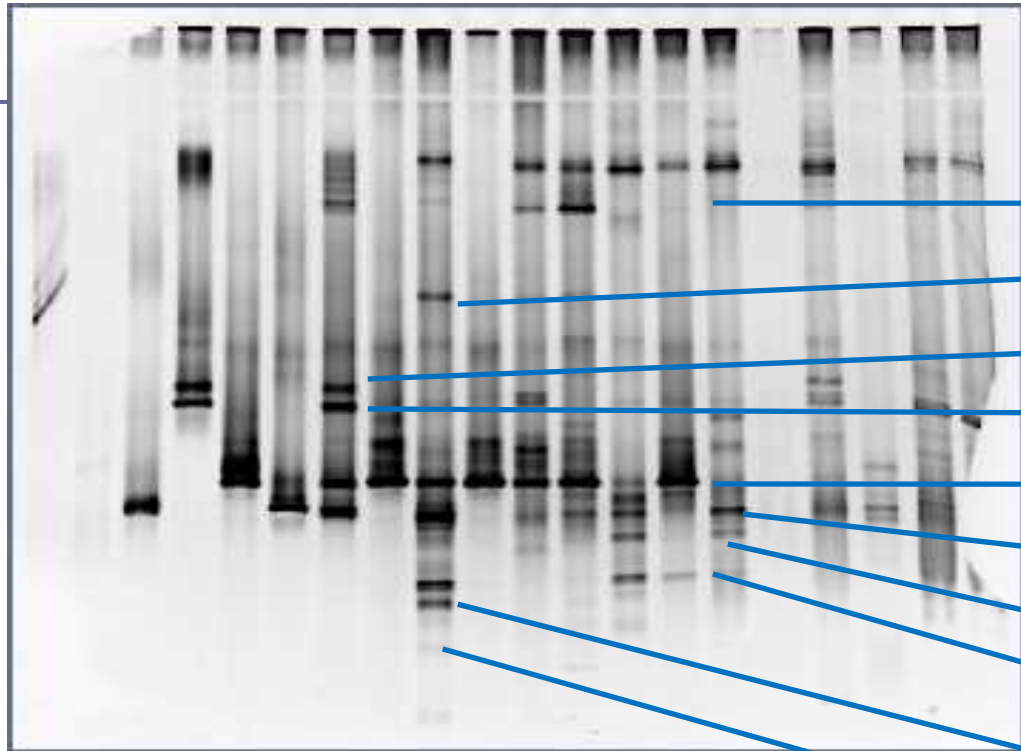


Blast



SEQUENCE

ATTGCGGATCGGCCCA



→ *Actinomyces odontolyticus*

→ *Arthrobacter* sp

→ *Rothia mucilaginoso*

→ *Rothia amarae*

→ *Pseudomonas aeruginosa*

→ *Pseudomonas synxantha*

→ *Ochrobactrum anthropi*

→ *Phycococcus dokdonensis*

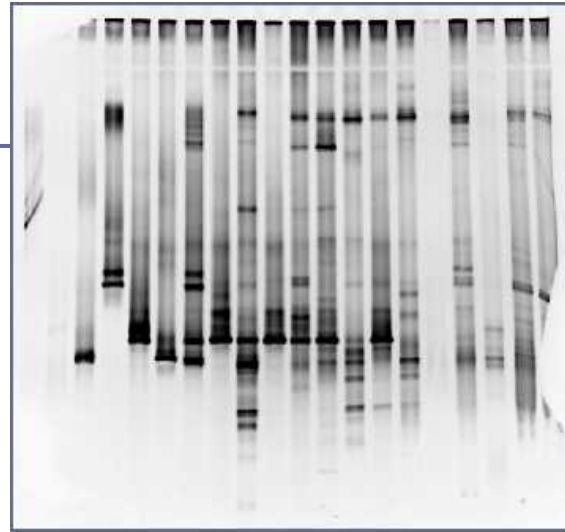
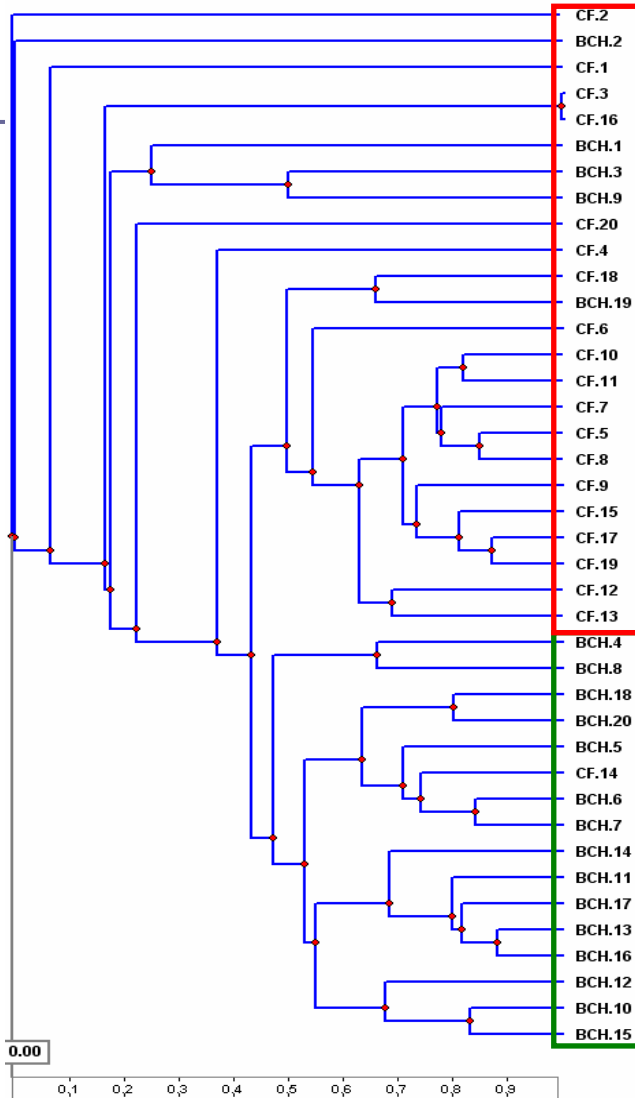
→ *Haemophilus influenzae*

→ *Moraxella* sp

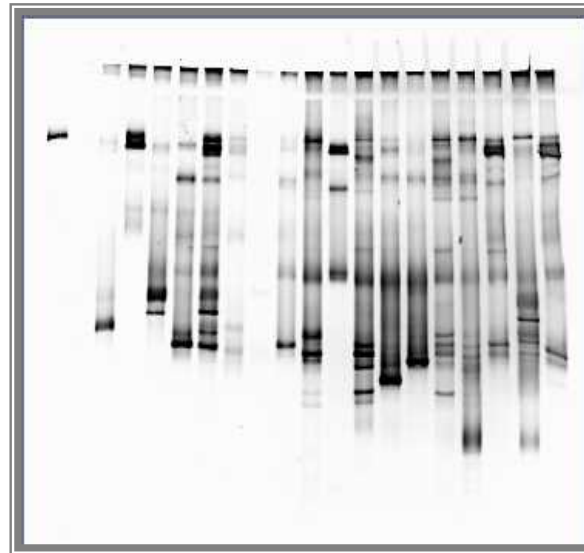
Other uncultured microorganisms related to:

Neisseria, *Streptococcus* or *Actinobacterium* groups

Coefficient: Dice Algorithm: UPGMA



Fibrosis
Quística



EPOC

MICROBIOTA

Fibrosis Quística

Pseudomonas aeruginosa
Haemophilus influenzae
Stenotrophomas maltophila
Moraxella spp,
Actinomyces odontolyticus
Rothia amarae
Pseudomonas synxantha
Phycococcus dokdonensis
Arthrobacter spp.
Ochrobactrum anthropi

EPOC

Haemophilus influenzae
Moraxella nonliquefaciens
Staphylococcus haemolyticus
Stenotropomonas maltophila
Rothia mucilaginosa
Streptococcus sps.
Neisseria spp.
Actinobacterium spp.
Arthrobacter spp
Ochrobactrum anthropi

Resultados

- La metagenómica es una herramienta útil para identificar la microbiota de esputo en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas.
- Además, es capaz de detectar bacterias ambientales y bacterias no cultivables en muestras de esputo de pacientes con FQ y bronquiectasias con EPOC.