

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



59

MICROBIOTA

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Rosa del Campo Moreno

Autores

Teresa Alarcón Caveró
Giuseppe D'Auria
Susana Delgado Palacio
Rosa del Campo Moreno
Manuel Ferrer Martínez



ISBN: 978-84-617-7001-4

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Alarcón Cavero T, D'Auria G, Delgado Palacio S, Del Campo Moreno, R, Ferrer Martínez, M. Microbiota. 59. Del Campo Moreno R (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo "Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org"

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

59. MICROBIOTA.2016

Coordinador:

Rosa del Campo Moreno¹

Autores:

Teresa Alarcón Cavero²
Giuseppe D'Auria³
Susana Delgado Palacio⁴
Rosa del Campo Moreno¹
Manuel Ferrer Martínez⁵



¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria-IRYCIS (Madrid), y Red Española de Investigación en Patología Infecciosa-REIPI (Sevilla), ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Princesa e Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (Madrid) y Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (Madrid), ³Servicio de Secuenciación y Bioinformática, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (Valencia) y Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública-CIBERESP (Madrid), ⁴Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-CSIC (Villaviciosa, Asturias), ⁵Instituto de Catálisis-CSIC (Madrid).

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción	5
2.	Microbiota humana.....	5
	2.1. Definiciones.....	5
	2.2. Microbiota intestinal.....	6
	2.3. Microbiota urinaria y vaginal.....	7
	2.4. Microbiota de la leche materna.....	7
	2.5. Microbiota de la placenta.....	8
	2.6. Microbiota del tracto respiratorio y de la cavidad oral.....	8
	2.7. Microbiota de la piel.....	9
3.	Evidencias científicas de la influencia de la microbiota en la salud y consideraciones clínicas.....	9
	3.1. Enfermedad inflamatoria intestinal.....	9
	3.2. Cáncer colorrectal.....	10
	3.3. Enfermedades metabólicas.....	10
	3.4. Enfermedades alérgicas y asma.....	11
	3.5. Enfermedades del sistema nervioso central.....	11
	3.6. Enfermedades de la cavidad oral.....	11
	3.7. Diarrea por <i>Clostridium difficile</i>	11
4.	Transferencia de materia fecal.....	12
5.	Determinación de la composición de la microbiota.....	13
	5.1 Elección de la muestra.....	13
	5.2 Recogida, conservación y transporte.....	13
	5.3 Extracción de ácidos nucleicos.....	13
	5.4 Método de secuenciación.....	14
6.	Estrategias para la caracterización de la microbiota.....	15
	6.1 Metataxonomía.....	15
	6.2 Metataxonomía de la fracción activa.....	16
	6.3 Metagenómica.....	17
	6.4 Metabolómica.....	18
7.	Bibliografía	19

DOCUMENTO TÉCNICO

1. PNT-MB-001. Detección e identificación de metabolitos bacterianos en heces mediante técnicas de metabolómica
2. PNT-MB-02. Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal.
3. PNT-MB-03. Transferencia de materia fecal.

1. INTRODUCCIÓN

La microbiota es el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) que reside en nuestro cuerpo, que a su vez pueden diferenciarse en comensales, mutualistas y patógenos. El término microbioma hace referencia a todo el hábitat, incluidos los microorganismos, sus genes, y las condiciones ambientales, pero en la práctica ambos términos se usan indistintamente, confundiendo el sufijo –bioma (comunidad) con el de –oma (conjunto). En cada una de las diferentes localizaciones de nuestro cuerpo, como la piel, las mucosas, el tracto respiratorio, la vagina o el tracto digestivo podemos encontrar ecosistemas microbianos complejos y adaptados a las particularidades de cada nicho. De todos ellos, el más complejo, diverso y numeroso es el asociado al aparato digestivo, particularmente en el ciego donde la densidad de microorganismos es la mayor que hay en nuestro cuerpo. Estas comunidades tienen un comportamiento simbiótico y mutualista con las células eucariotas humanas, son imprescindibles para el correcto funcionamiento de nuestro cuerpo, mantienen un importante diálogo con el sistema inmune y tienen funciones homeostáticas que condicionan nuestra salud. Numerosas evidencias científicas han implicado al microbioma intestinal y su potencial metabólico en diversos estados patológicos en los últimos años, originando nuevas estrategias terapéuticas para controlar y regular este ecosistema. Entre estos nuevos enfoques se encuentra la transferencia de microbiota fecal con una popularidad creciente dado su éxito en el tratamiento de la diarrea recurrente causada por *Clostridium difficile*.

El conocimiento de nuestro microbioma se ha visto considerablemente ampliado tras la utilización de las técnicas moleculares de secuenciación masiva, especialmente las de segunda generación, también conocidas como “*next generation sequencing*” (NGS). Para determinar la composición de la microbiota siempre se han utilizado cultivos microbiológicos, pero hoy en día se sabe que la mayor parte de los microorganismos de este ecosistema no se pueden cultivar con los medios tradicionales, siendo únicamente posible su detección tras la secuenciación de ADN como huella genética. La utilización de técnicas moleculares basadas en la secuenciación masiva, particularmente las del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr (gen ADNr 16S) y las herramientas de análisis masivo de datos (técnicas meta-ómicas), han permitido identificar y asignar taxonómicamente a la mayoría de los microorganismos sin necesidad

de cultivarlos. Este avance, así como otras técnicas microbiológicas que se detallarán en el presente procedimiento, han supuesto una verdadera revolución en el conocimiento de la microbiota y de su implicación en los estados de salud y enfermedad del ser humano.

2. MICROBIOTA HUMANA

2.1. DEFINICIONES

Conocer el número de microorganismos que alberga nuestro cuerpo ha sido un tema no exento de debate. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado de forma fehaciente que el número de bacterias en nuestro cuerpo es del mismo orden que el de células eucariotas humanas en una persona de referencia de 70 kg. Desde el nacimiento existe una relación simbiótica entre la microbiota y nuestras células que evoluciona en el tiempo, adaptándose a los cambios. Por su enorme capacidad metabólica, se ha considerado a la microbiota como un “órgano” imprescindible para la vida y con influencia en la salud y la enfermedad. Su composición presenta particularidades y características propias de cada individuo, pudiendo variar en función de la base genética, la dieta, y la interacción con el medio ambiente.

El estudio de este ecosistema es un campo de rápido avance científico, aceptando universalmente que para alcanzar un estado de salud adecuado es necesario tener también una microbiota “sana”. Nuestra microbiota experimenta cambios, como consecuencia de la influencia de múltiples factores, de un modo similar a los que experimenta cualquier órgano de nuestro cuerpo desde la ontogenia a la muerte. Continuamente estamos expuestos a factores que pueden influenciarla, pero ella tiene una gran capacidad de resiliencia (capacidad de adaptación frente a un agente perturbador o una situación adversa, con posterior recuperación del estado inicial cuando cesa la perturbación), recuperando inmediatamente su estado natural, que se denomina con el término eubiosis. El nivel de estos cambios viene definido no solo por la naturaleza, la fuerza y la duración de la perturbación, sino también por la composición y estabilidad de cada microbiota asumiendo que cada una es única para cada persona. En algunas ocasiones, la naturaleza de la perturbación es tan fuerte, que condiciona alteraciones en su composición y/o en su

funcionamiento, alcanzando un estado de disbiosis. La disbiosis puede producirse en cuestión de días, particularmente tras la ingesta de antibióticos, pero también puede ser consecuencia de otras acciones a más largo plazo fundamentalmente relacionadas con la dieta.

Para conocer el grado de disbiosis en nuestra microbiota, primero es importante conocer la diversidad y variabilidad de nuestros microorganismos, teniendo en cuenta las particularidades de cada individuo. De forma general, y en base a estimaciones recientes, podemos decir que nuestra piel (1,8 m² de superficie), el tracto gastrointestinal (300-400 m²), el sistema respiratorio (160 m²), la cavidad oral (215 cm²), y las cavidades vaginal y urinaria (90 cm²) pueden estar colonizadas por hasta 5.000 especies microbianas en una persona adulta. A continuación se detallan las particularidades de los principales ecosistemas microbianos que albergamos en nuestro cuerpo.

2.2. MICROBIOTA INTESTINAL

Clásicamente se ha considerado que la colonización microbiana del tracto gastrointestinal comenzaba inmediatamente tras el nacimiento, pero en los últimos años se ha demostrado que se inicia intraútero (ver más adelante la microbiota de la placenta). En las primeras deposiciones del recién nacido, el meconio, se pueden detectar bacterias aunque en muy baja concentración, siendo en las deposiciones posteriores donde se observa un aumento en la biodiversidad y en la cantidad de microorganismos. Tras la introducción de la alimentación sólida a la edad de 2-3 años, la microbiota intestinal alcanza su estado de madurez, y su composición puede permanecer estable durante toda la vida adulta, aunque hay numerosos factores que pueden alterarla, siendo los más importantes la dieta y la ingesta de antibióticos. Dado las particularidades individuales y temporales de este ecosistema, es muy difícil establecer parámetros para definir una microbiota normal, pero en general se considera que es más saludable cuanto mayor sea su diversidad y equilibrio entre las especies.

En una persona adulta, el tracto gastrointestinal puede albergar entre 500 y 1.000 especies de microorganismos, siendo las bacterias de los filos *Bacteroidetes* (~25%) y *Firmicutes* (~60%) los mayoritarios. En menor proporción se detectan *Proteobacteria*,

Verrucomicrobia, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Spirochaetes*, las arqueas, los hongos, los protozoos, los virus y otros microorganismos. También es importante mantener las proporciones equilibradas, y por ello se ha establecido el ratio *Firmicutes/Bacteroides* como un parámetro para evaluar el equilibrio de la microbiota intestinal, y su funcionalidad. En los obesos este ratio está muy alterado por el aumento de los *Firmicutes*. El aumento de *Firmicutes* también se ha descrito en ancianos de forma fisiológica como consecuencia de la edad.

Las principales funciones de la microbiota intestinal son prevenir la colonización por otros microorganismos patógenos, ayudar a digerir los alimentos, producir vitaminas B y K que el organismo humano no es capaz de sintetizar y, finalmente, y no menos importante, estimular al sistema inmune. Tras el nacimiento, las células del sistema inmune carecen de estímulos, reconociendo a todos los antígenos de su alrededor como parte del organismo y bloqueando la respuesta inflamatoria contra ellos. Es por ello, que los primeros contactos de la microbiota con las líneas celulares inmunológicas sin diferenciar son muy importantes, y van a ayudar a definir lo que es lo "propio" de lo "extraño". Este sistema y la microbiota intestinal mantienen un diálogo continuo con carácter mutualista, pero si esta situación se desequilibra puede iniciarse un proceso patológico. Esta parece ser la base de ciertas enfermedades autoinmunes donde los antígenos de la microbiota intestinal representan un estímulo suficientemente grande como para desencadenar una respuesta inflamatoria. En otras patologías, como el síndrome metabólico y la obesidad, también se atribuye a la microbiota intestinal el origen del estímulo que origina una respuesta inflamatoria basal continuada.

Recientemente se ha descrito la existencia del eje cerebro-intestino que conecta el sistema nervioso central con la microbiota intestinal a través del nervio vago, el sistema parasimpático, los metabolitos bacterianos que pueden tener acciones como neurotransmisores y el sistema endocrino asociado al tracto digestivo. Así pues, además de las enfermedades que clásicamente se han relacionado con alteraciones en la microbiota como la obesidad, la diabetes tipo 2, las enfermedades inflamatorias del intestino y las alergias, últimamente también se ha relacionado otras patologías del sistema nervioso central como el autismo, la ansiedad, la depresión y la dependencia alcohólica.

2.3. MICROBIOTA URINARIA Y VAGINAL

En condiciones normales, la microbiota del tracto urinario está formada por un rango muy amplio de 20 a 500 especies bacterianas distribuidas en nueve filos mayoritarios, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* y en menor medida *Chloroflexi*, *Spirochaetes*, *Synergistetes* y *Fibrobacteres*. La cavidad vaginal puede estar colonizada por más de 280 especies de bacterias, aunque las mayoritarias se agrupan en 25 especies. En particular, la vagina, como todas las mucosas y epitelios expuestos al exterior, alberga una microbiota propia que la protege frente a la colonización por microorganismos indeseables. La microbiota vaginal va evolucionando y cambiando a lo largo de la vida de la mujer con la edad y el estado hormonal, existiendo cambios importantes durante el período menstrual, el embarazo y el puerperio o la menopausia.

Aunque la colonización de la vagina se inicia con el nacimiento, la microbiota es escasa durante la infancia, y es con la primera menstruación, y gracias al aumento de la humedad vaginal y la secreción de nutrientes, cuando empieza a establecerse una microbiota vaginal definitiva. Uno de los primeros estudios en describir la complejidad de la microbiota vaginal usando tecnología de secuenciación masiva analizó 400 mujeres de diferentes etnias en edad fértil identificando hasta 5 comunidades tipo con un predominio claro de las siguientes especies de lactobacilos: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus gasseri*. Con la menopausia se produce la interrupción del ciclo estrogénico, provocando una reducción de la densidad microbiana vaginal. La composición de la microbiota vaginal también se ve afectada durante las menstruaciones y las variaciones mensuales en la concentración hormonal. La disminución de los lactobacilos por causas fisiológicas (como la menstruación o el envejecimiento) o intervencionistas (como los dispositivos intrauterinos) puede provocar infecciones vaginales y desencadenar vaginosis bacteriana o vaginitis por especies de *Candida*. En el tratamiento de estas patologías se utilizan sobre todo antibióticos, específicamente para combatir la vaginosis bacteriana causada por *Gardnerella vaginalis*, y antifúngicos para las candidiasis. Desde la Asociación Española para el Estudio de la Menopausia (AEEM) y la Asociación Española de Medicina Antienvjecimiento y Longevidad (SEMAL) se

recomienda el uso de probióticos, particularmente lactobacilos, para restaurar el equilibrio de la microbiota vaginal tras una infección por bacterias o por hongos.

El paso por el canal del parto supone una inoculación directa de la microbiota vaginal de la madre al recién nacido. Esta inoculación se ha considerado beneficiosa para el niño, ya que la instauración de la microbiota del recién nacido es más equilibrada cuando el parto ocurre por vía vaginal que por cesárea. Para solventar este problema en los niños nacidos mediante cesárea, se ha propuesto frotar la cara del niño con una gasa que ha sido introducida previamente en la vagina de la madre durante una hora, simulando el paso por el canal del parto.

2.4. MICROBIOTA DE LA LECHE MATERNA

Durante mucho tiempo se consideró que la leche de todos los mamíferos era un fluido estéril, excepto cuando procedía de una glándula infectada. Estudios en las últimas décadas han revelado que tanto el calostro como la leche humana son una fuente de microorganismos que colonizan y dominan el intestino del lactante. Las primeras descripciones de la diversidad bacteriana en muestras de leche procedentes de mujeres sanas se realizaron con cultivos microbiológicos, demostrando la presencia de bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium*. Estas bacterias constituyen la microbiota endógena de la glándula mamaria durante la lactancia y, por ende, de la leche humana. La secuenciación masiva ha proporcionado una visión complementaria, confirmando la presencia de estafilococos, estreptococos, bacterias lácticas, corinebacterias, propionibacterias o bifidobacterias. En los últimos años también se han evidenciado bacterias anaerobias estrictas de los géneros *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Bacteroides* o *Ruminococcus*, típicamente asociadas al ecosistema intestinal.

Se ha descrito la ruta enteromamaria, que implica a células del sistema inmune (células dendríticas, macrófagos) capaces de seleccionar y vehiculizar determinadas bacterias desde el intestino de la madre hasta la leche, y finalmente al intestino del niño. Al final de la gestación y durante la lactancia, se ha descrito una elevada tasa de traslocación bacteriana desde el intestino hacia los ganglios linfáticos mesen-

téricos primero, y a la glándula mamaria después, lo que podría contribuir a enriquecer la microbiota de la leche con bacterias de origen intestinal. En las mujeres lactantes se han evidenciado bacterias circulantes asociadas a células del sistema inmune, tanto en la propia leche como en sangre periférica, además de una gran cantidad de ADN bacteriano libre.

2.5. MICROBIOTA DE LA PLACENTA

La placenta es el órgano que intercambia nutrientes, gases y otras sustancias entre la madre y el feto durante la gestación. Al igual que sucede con la microbiota de la leche materna, el origen de la microbiota asociada a la placenta es un tema actual no exento de debate. Mientras que esta cavidad siempre se ha considerado estéril, las técnicas de secuenciación masiva han permitido revelar que ésta alberga una microbiota propia aún en ausencia de infección histológica intrauterina (el diagnóstico de la corioamnionitis se puede encontrar en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 54). Durante décadas, únicamente se ha buscado la presencia de bacterias en muestras biológicas relacionadas con el embarazo (corioamnios, líquido amniótico o meconio) cuando la infección intrauterina era evidente. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de una microbiota estable en líquido amniótico, en la sangre de cordón umbilical y en la placenta en mujeres sin episodios de infección o inflamación. Esta microbiota se caracteriza por ser poco abundante pero metabólicamente muy activa. Su composición es similar a la del tracto gastrointestinal, y en concreto se parece mucho a la microbiota de la cavidad oral, estando constituida por *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Fusobacteria*, y siendo particularmente frecuente el aislamiento de estreptococos, estafilococos y propionibacterias.

Se han propuesto varias rutas de acceso de los microorganismos a la cavidad amniótica (vaginal, sangre, peritoneo o tras procedimientos invasivos), aunque la vía hematogena parece ser la más probable, tanto por el habitual aislamiento de bacterias comensales en sangre de cordón umbilical en mujeres y niños sanos, como por su gran similitud con la microbiota oral. La existencia de esta ruta explicaría en gran medida la asociación que existe entre alteraciones de la microbiota oral (enfermedad periodontal o gingivitis), la corioamnionitis y los partos prematuros. Como se comentó anteriormente en la ruta entero-mamaria, determinadas bacterias de la microbiota oral y/o gastrointestinal de la madre podrían movilizarse desde el

tracto digestivo a lugares remotos con la colaboración de células dendríticas, que pueden penetrar el epitelio y tomar bacterias directamente del lumen intestinal.

Finalmente, también se ha descrito una microbiota del meconio como reflejo de la colonización intestinal que se establece antes del nacimiento. En niños sanos, las bacterias del meconio pertenecen principalmente al filo *Firmicutes*.

2.6. MICROBIOTA DEL TRACTO RESPIRATORIO Y DE LA CAVIDAD ORAL

El pulmón siempre ha sido considerado como un órgano estéril, pero recientemente se sabe que también tiene una microbiota funcional y estable. La microbiota del tracto respiratorio inferior no ha sido suficientemente estudiada, ya que casi siempre se analiza en el esputo inducido que no es una muestra representativa. La obtención de muestras adecuadas, como son el lavado broncoalveolar o las biopsias de tejido pulmonar, es complicada por utilizar procedimientos invasivos. Tampoco hay suficientes estudios que analicen la variación de la microbiota pulmonar en relación a factores externos ambientales y del propio hospedador. Algunos trabajos han puesto de manifiesto la semejanza en composición de la microbiota del tracto respiratorio inferior con la de la vía respiratoria superior, pero con menor densidad y diversidad. Se han descrito hasta 314 especies diferentes pertenecientes a los filos *Bacteroidetes* (*Prevotella* y *Bacteroides*), *Firmicutes* (*Veillonella*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*), y *Proteobacteria* (*Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Neisseria* y *Acinetobacter*).

La microbiota de la cavidad oral es particularmente abundante y diversa. Se han descrito hasta, 600 especies en sujetos sanos, distribuidas en 13 filos (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *SR1*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, y *Candidate division TM7*). Las principales características de esta microbiota son la formación de biopelículas y su gran biodiversidad con enriquecimiento de bacterias anaerobias. Hay una predominancia clara del género *Streptococcus*, pero también se han descrito otros como *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacteria*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, y *Propionibacterium*. Dentro de la boca existen muchos microambientes condicionados por los factores anatómicos (dientes, encías o cavidades), los factores físicos

(fricción con los alimentos o existencia de caries) y los factores químicos (pH o saliva).

2.7. MICROBIOTA DE LA PIEL

Al igual que ocurre en otras localizaciones, las nuevas técnicas moleculares de secuenciación masiva han descubierto una microbiota presente en la piel con una mayor diversidad que las atribuidas por los cultivos microbiológicos tradicionales. La piel es el órgano humano de mayor tamaño con una superficie de 1,8 m², contiene numerosos microhábitats condicionados por las variaciones anatómicas como los surcos, el vello, las glándulas sudoríparas y sebáceas. De forma general, en la piel se ha descrito una densidad bacteriana media de $\sim 1 \times 10^7$ bacterias por cm² que está formada por al menos 150 especies, siendo predominantes los géneros *Corynebacterium*, *Propionibacterium* y *Staphylococcus*. Es importante diferenciar entre la microbiota habitual de la piel, a la que se denomina como microbiota residente, y la microbiota transitoria que podemos adquirir tras la exposición a superficies contaminadas. Las bacterias de la piel a su vez pueden tener un comportamiento comensal o patógeno. Cada cuatro semanas la piel se renueva al completo, eliminando las células más superficiales mediante descamación, y también bacterias de la microbiota residente.

3. EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LA INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA EN LA SALUD Y CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Actualmente se acepta que para alcanzar un estado de salud integral es necesario que nuestra microbiota, particularmente la asociada al tracto gastrointestinal, también esté sana. Los principales indicadores de salud de la microbiota son su riqueza (cantidad de microorganismos) y su biodiversidad (cantidad de especies). Ambos parámetros se evalúan con los índices de biodiversidad de tipo alfa, como el de Shannon (refleja la heterogeneidad de una comunidad en base al número de especies presentes y su abundancia relativa), y el índice de Chao (abundancia y representación de cada especie en todas las muestras).

Se han publicado numerosas asociaciones entre estados patológicos y alteraciones de la microbiota, bien por presencia o aumento de determinados géneros, o justamente por lo contrario, ausencia o disminución de su concentración. Para evaluar y

comparar la microbiota de un paciente con la de un sujeto sano, se emplean métodos computacionales de ordenación como el método de agrupamiento (*clustering*) o de reducción de las dimensiones de las matrices de distancias que definen el conjunto de las muestras de cada estudio. También se puede realizar un análisis de componentes principales (PCA) que permite añadir otras variables clínicas.

La composición de nuestra microbiota está influenciada por numerosos factores, siendo los más importantes la dieta, la edad y la ingesta de antibióticos. Los filos más influenciados en estos cambios son también los más abundantes, sobre todo y por este orden *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, y *Fusobacteria*.

La mayoría de los estudios publicados, describen la composición de la microbiota intestinal de los pacientes en comparación con la de individuos sanos evaluando en ocasiones su evolución en el tiempo respecto de los datos clínicos. Aunque cada vez son más numerosas las evidencias de la implicación de la microbiota en diversas enfermedades, no en todas las patologías se tiene una certeza plena de esta asociación. Las mayores evidencias se han detectado a nivel local (enfermedad inflamatoria intestinal, diarrea por *C. difficile* o cáncer colorrectal) o a nivel sistémico (enfermedades metabólicas, alérgicas y asma, o del sistema nervioso central). Lo que aún está por demostrar en muchos de los casos, es si los cambios que se observan en la microbiota son la causa o la consecuencia de la enfermedad. A continuación se describen algunas de las patologías en las que existen evidencias científicas de una microbiota alterada.

3.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Agrupamos desórdenes crónicos del tracto intestinal, de etiología no bien definida, que cursan con gran inflamación y en forma de brotes. Según su presentación clínica puede ser colitis ulcerosa, inflamación continua en la capa intestinal superficial localizada al inicio del colon y/o recto; o enfermedad de Crohn, con un patrón inflamatorio en cualquier lugar del intestino y de forma discontinua. Estas enfermedades se han asociado a factores genéticos (sobre todo en la enfermedad de Crohn) y ambientales, si bien también se relacionan con la exposición a antibióticos durante la infancia (particularmente en la enfermedad de Crohn) o al tabaquismo, que agrava

la enfermedad de Crohn pero tiene el efecto opuesto en la colitis ulcerosa. Se ha sugerido la participación de otros factores, como la dieta y las infecciones durante la infancia, pero sin resultados concluyentes. La implicación de la microbiota intestinal en esta enfermedad se deduce por diferentes hechos: los animales gnotobióticos (libres de microorganismos) son incapaces de desarrollar colitis ulcerosa, los pacientes con enfermedad de Crohn presentan polimorfismos en los genes que codifican para los receptores de antígenos bacterianos, y en ambos cuadros se ha observado una mejoría clínica tras el uso de antibióticos y/o probióticos.

Lo más característico de esta enfermedad es la inflamación intestinal mantenida que podría ser provocada por la activación de receptores del sistema inmune por microorganismos, principalmente bacterias. La microbiota intestinal de estos pacientes presenta una marcada reducción de su biodiversidad, con una disminución importante de *Firmicutes*. En los pacientes con enfermedad de Crohn se evidencia una reducción de los géneros pertenecientes al grupo *Clostridium* IV, que funcionalmente se relaciona con la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), sobre todo el butirato que tiene importantes propiedades antiinflamatorias. De hecho, se ha comprobado una disminución de los niveles de acetato y butirato en las heces de estos pacientes. Además, en algunos casos se ha detectado *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en sangre y tejidos, así como algunas enterobacterias, especialmente *Escherichia coli* invasiva adherente. A pesar de todo ello, no existen datos concluyentes de la implicación de la microbiota, pero en el caso de la colitis ulcerosa se ha descrito la remisión clínica tras transferencia de microbiota fecal, aunque no funciona igual de bien en todos los pacientes.

3.2. CÁNCER COLORRECTAL

La microbiota intestinal podría estar implicada en el proceso del cáncer colorrectal a través de la producción de metabolitos tóxicos o por provocar una respuesta inmune exagerada ante el estímulo bacteriano. La alimentación que se asocia con un mayor riesgo de cáncer de colon son las dietas ricas en grasas y proteínas animales pero pobres en fibra; mientras que una alta ingesta en frutas, vegetales, cereales y pescado se asocia con una disminución del riesgo. Además, la alimentación puede ser determinante en promover el crecimiento de bacterias reductoras de sulfato, que producen sulfuro de hidrógeno, que es tóxico para el epitelio intestinal. Por otro lado, una excesiva producción de

butirato puede inducir la apoptosis, detener el ciclo celular y su diferenciación. Estudios en modelos animales muestran que en condiciones de esterilidad no es posible desarrollar cáncer, pero los mismos animales tras la adquisición de una microbiota intestinal sí son capaces de reproducir el proceso tumoral. Las especies bacterianas que se han relacionado con el cáncer de colon pertenecen a los géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium* y/o *Lactobacillus*, pero es importante destacar que no existe suficiente consistencia científica. Por el contrario, sí se ha detectado una asociación estadísticamente significativa entre una bacteriemia/endocarditis por *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y la existencia de un cáncer de colon, generalmente sin diagnosticar. Además se ha observado una clara respuesta proinflamatoria en modelos animales tras la exposición de antígeno de la pared celular de esta bacteria.

3.3. ENFERMEDADES METABÓLICAS

Una de las funciones más importantes de la microbiota intestinal es la de contribuir a la digestión de alimentos para obtener energía. En los sujetos obesos se ha descrito una mayor recuperación energética de los alimentos, ya que su microbiota utiliza rutas metabólicas alternativas que son capaces de degradar hidratos de carbono indigeribles (fibras). La implicación de la microbiota en esta enfermedad se ha demostrado en modelos animales, en pacientes y en gemelos monocigóticos, donde se ha observado una disminución de la densidad del filo *Bacteroidetes*, y por tanto una alteración del cociente *Firmicutes/Bacteroidetes*. Determinadas especies se asocian con fenotipos delgados, y se cree que confieren un papel protector frente a la obesidad. Es el caso de *Akkermansia muciniphila*, a la que se atribuye la regulación del tránsito intestinal, la disminución de la resistencia a la insulina, el aumento de la actividad metabólica, y del metabolismo lipídico.

Recientemente, se ha podido reproducir el fenotipo obeso o delgado en ratones tras la implantación de sendas microbiotas mediante transferencia fecal. Estos experimentos demuestran la importancia de un correcto establecimiento de la microbiota en las primeras etapas de la vida. También se sospecha que el uso de antibióticos antes de los 6 meses de vida puede contribuir al desarrollo de obesidad en la etapa adulta. Por el contrario, la administración perinatal de *Lactobacillus rhamnosus* GG se ha asociado con una menor ganancia de peso durante la infancia.

La diabetes tipo 2 es un desorden complejo que presenta elementos genéticos y ambientales. Actualmente, es un importante problema de Salud Pública en el mundo, y se sospecha que la microbiota intestinal también puede ser un factor importante. Los individuos con diabetes tipo 2 presentan pequeñas diferencias en la composición de su microbiota frente a los controles, pero se ha demostrado que tienen una importante reducción de bacterias productoras de butirato. Por el momento se considera que la patofisiología de esta enfermedad se relaciona más con una disbiosis funcional que con la alteración en la composición de la microbiota.

3.4. ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y ASMA

En los últimos años se ha observado un aumento drástico de la incidencia de enfermedades alérgicas y de asma en países industrializados, en parte asociado a la propia industrialización, pero también se ha relacionado con una reducción de la exposición a microorganismos durante el periodo neonatal y los primeros años de vida. A esta teoría se la conoce como la hipótesis de la higiene, y hace énfasis en la importante exposición a los microorganismos en los recién nacidos y en la infancia para favorecer una buena estimulación del sistema inmune. Cuando se compara la microbiota intestinal de niños de tan solo 3 semanas, se observan diferencias en su composición entre niños atópicos y no atópicos, principalmente por la mayor proporción de bifidobacterias en niños sanos. Sin embargo, estas diferencias ya no se evidencian a los 3 meses de edad, aunque la diversidad de la microbiota intestinal de niños con enfermedad atópica siempre es menor.

Se ha descrito una alta concentración intestinal de lactobacilos y eubacterias en niños con baja prevalencia de alergia, mientras que los niños alérgicos presentan una gran densidad de clostridios en sus heces. Además, los niños alérgicos tienen mayor densidad de coliformes y estafilococos, presentando menor cantidad de lactobacilos y bifidobacterias. En diversas especies de estos dos géneros se han descrito propiedades beneficiosas que confieren un papel protector frente al desarrollo de alergias y se usan con frecuencia como probióticos.

3.5. ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La microbiota intestinal y el sistema nervioso central están conectados mediante el eje cerebro-intestinal y mantienen un diálogo bidireccional canalizado prin-

cipalmente a través del nervio vago. Esta vía de comunicación integra sistemas de señalización neuronales, hormonales e inmunológicos entre el intestino y el cerebro. Además, permite al cerebro controlar y ordenar funciones gastrointestinales, como la peristalsis, la producción de mucina y funciones inmunes, pero también asegura la actividad de la microbiota y sus metabolitos influenciando las funciones cerebrales. Los lactobacilos y las bifidobacterias son capaces de sintetizar ácido gamma-aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor cerebral, mientras que *E. coli*, *Bacillus* y *Saccharomyces* producen norepinefrina; *Candida*, *Streptococcus*, *E. coli* y *Enterococcus* excretan serotonina; y finalmente dopamina es uno de los productos finales del metabolismo de *Bacillus* y *Serratia*. Se ha publicado una relación entre la microbiota intestinal y el estado anímico, pudiendo existir una microbiota ligada a estados de depresión/ansiedad por consumo excesivo de triptófano.

En enfermedades autoinmunes, particularmente en la esclerosis múltiple, se ha sugerido que el estímulo que activa a los linfocitos se localiza en el intestino, más concretamente en la microbiota intestinal. La envoltura lipídica de las bacterias tiene un gran parecido estructural y en su composición con la mielina que recubre los axones del sistema nervioso central, por lo que esta enfermedad podría estar causada por un mecanismo de mimetismo molecular.

3.6. ENFERMEDADES DE LA CAVIDAD ORAL

Además de la caries, las principales enfermedades de la cavidad oral producidas por bacterias son la gingivitis y la periodontitis. La microbiota oral sana se caracteriza por la formación de biopelículas aún en condiciones de salud, pero cuando la higiene no es adecuada, estas biopelículas se engrosan considerablemente, aumenta el número de especies que contiene, y desarrollan una inflamación en el surco gingival. También se ha sugerido una asociación entre una mala higiene bucal y la endocarditis bacteriana, la halitosis, y las infecciones tras endodoncia.

3.7. DIARREA POR *Clostridium difficile*

En los últimos años la infección por *C. difficile* se ha convertido en un creciente problema hospitalario, pero también extrahospitalario, especialmente tras la irrupción de ribotipos hipervirulentos y epidémicos, como es el R027. La infección puede recurrir en

el 20-30% de los casos, asociada principalmente a factores como tratamientos antibióticos, cepas hipervirulentas, pacientes pluripatológicos, sexo femenino o la falta de respuesta inmune adaptativa.

Una microbiota intestinal alterada contribuye al desarrollo y mantenimiento de la infección y, por lo tanto, también en las recurrencias. Los pacientes con infección por *C. difficile* tienen una disminución significativa del resto de especies de la microbiota intestinal. En un estudio reciente (Sangster *et al.*, 2016) se ha demostrado que la infección por *C. difficile* se asocia con el aumento de *Peptostreptococcaceae* y *Enterococcus*, bacterias que degradan mucina como *Akkermansia muciniphila* y del hongo *Penicillium*. Parece que estos microorganismos contribuyen a la disbiosis intestinal asociada con la infección por *C. difficile*. En cualquier caso, la transferencia de material fecal ha sido universalmente aceptada como la mejor opción terapéutica en caso de recidivas de la diarrea.

4. TRANSFERENCIA DE MATERIA FECAL

La transferencia de materia fecal fue reconocida como una de las diez mejores innovaciones médicas del año 2014 por la Cleveland Clinic de Estados Unidos (http://www.cleveland.com/healthfit/index.ssf/2013/10/cleveland_clinic_announces_top.html). En Estados Unidos en julio de 2013, la organización americana *Food and Drug Administration* (FDA) reguló el empleo de heces humanas como un medicamento, y esta técnica debe cumplir los requisitos específicos para la solicitud y aplicación de nuevas medicinas. En 2014, un artículo publicado en la prestigiosa revista *Nature* abogaba por el reconocimiento de las heces humanas como un tejido y recomendaba la implementación de bancos fecales con fines médicos y de investigación.

En lo que respecta a España, las heces no se consideran en la actualidad un tejido y por tanto se encuentran fuera de la directiva del Real Decreto Ley 9/2014 y de las competencias de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT). Por otro lado, la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) no considera como un medicamento la transferencia de heces. Así pues, actualmente no existe un entorno de regulación, ni un marco legal que ampare este procedimiento.

Por el momento la única indicación para la transfe-

rencia fecal es la recidiva de la diarrea por *C. difficile*, donde lo que se busca es restaurar de una forma ecológica la diversidad bacteriana y la disbiosis causada por la diarrea y el patógeno. Las primeras guías recomendaban realizar la transferencia en la tercera recidiva, sin embargo en una reciente revisión se sugiere su realización tras el segundo episodio de diarrea. En los casos en los que la transferencia no obtenga resultados inmediatos, se puede realizar una segunda transferencia en las mismas condiciones, y en el caso de que vuelva a fallar se puede volver a hacer pero utilizando otro donante.

Existen otras patologías donde la transferencia de materia fecal tiene un gran potencial terapéutico: la enfermedad inflamatoria intestinal, la obesidad, el síndrome metabólico, las enfermedades autoinmunes, las alergias, el síndrome de fatiga crónica y algunas enfermedades neuropsiquiátricas. Para todas estas enfermedades se han publicado estudios con transferencia de materia fecal, aunque los resultados no han sido tan exitosos como en la diarrea por *C. difficile*. De todas ellas, la colitis ulcerosa es la que mejores resultados clínicos tiene, aunque parece que el éxito es donante-dependiente para cada paciente.

Los efectos secundarios de este procedimiento suelen ser escasos y poco relevantes. Recientemente se ha realizado una revisión de 50 publicaciones relacionadas con la transferencia fecal donde se pone de manifiesto que un gran número de pacientes sufrieron efectos adversos. Muchos de estos efectos secundarios están asociados a la vía de administración de la infusión, siendo la colonoscopia la vía más segura. Se han descrito casos de muerte por neumonía por aspiración, casi siempre ligados a la administración por tubo nasogástrico. Sin embargo todos los estudios señalan que por el momento no se conocen los efectos adversos de la transferencia de heces a largo plazo. La ausencia de enfermedades transmisibles en el donante es un requerimiento imprescindible, y las guías internacionales recogen las patologías que hay que descartar antes de aceptar a un donante. Básicamente, el estudio que se hace al donante es semejante al que se realiza en cualquier trasplante de órganos. Sin embargo hay factores que no se suelen tener en cuenta como la obesidad o la condición anímica del donante que podrían repercutir en el receptor. Se ha descrito que una paciente desarrolló obesidad a los dos años de una transferencia de heces para curar una diarrea por *C. difficile* con las heces de una donante obesa.

Otra de las posibles aplicaciones de la transferencia de materia fecal es la descontaminación intestinal de pacientes colonizados por bacterias multiresistentes a los antibióticos. Por el momento se ha descrito la erradicación de enterococos resistentes a vancomicina, estafilococos resistentes a meticilina y *Klebsiella* spp. productora de carbapenemasa.

Sin lugar a dudas el éxito de este procedimiento reside en las heces del donante. Es importante utilizar deposiciones recientes para evitar la muerte de las bacterias, sobre todo las anaerobias, aunque también se ha demostrado la utilidad de muestras que han sido congeladas. Las condiciones óptimas de manejo en el laboratorio incluyen condiciones estrictamente anaerobias. Sin embargo, no siempre es posible procesar las muestras de heces inmediatamente después de su recogida, con lo que las necesidades de ambiente anaerobio se pueden ver comprometidas. Por ello se recomienda su procesamiento lo más rápido posible, siempre que sea posible en estaciones de trabajo en anaerobiosis y con soluciones o diluyentes que incorporen agentes reductores como la cisteína, el glutatión o el ácido ascórbico.

Se han dedicado pocos o prácticamente ningún estudio a la evaluación de las técnicas y condiciones más adecuadas para la obtención y preservación viable de la microbiota intestinal obtenida de las heces. Recientemente, se ha descrito un procedimiento que permite separar la mayor parte de la microbiota intestinal del resto de materia fecal, facilitando la manipulación de la microbiota y el procedimiento de transferencia de materia fecal. Esta técnica consiste en un sencillo proceso de ultracentrifugación en gradiente, que no afecta a la composición de poblaciones microbianas, y que hace que los distintos componentes fecales se separen por densidad. Esta estrategia demostró ser útil para obtener microbiotas intestinales representativas a partir de muestras fecales con una recuperación de hasta 10^9 bacterias viables por gramo de heces.

5. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA

Son varios los métodos y las técnicas que se pueden utilizar para analizar tanto la composición como la funcionalidad de nuestra microbiota, pero antes de describirlos es necesario describir algunas circunstancias previas en las que se pueden

cometer sesgos importantes que van a condicionar el resultado final de nuestro estudio. Estas circunstancias son la elección de la muestra, su conservación y transporte, y el método de extracción de ácidos nucleicos.

5.1. ELECCIÓN DE LA MUESTRA

Como se ha descrito anteriormente, cada zona de nuestro cuerpo alberga su particular microbiota y por lo tanto, la muestra dependerá de la zona a estudiar. La gran mayoría de los estudios se centran en la microbiota intestinal, ya que es la más numerosa y la que más implicación tiene en nuestro estado de salud. Para el estudio de esta comunidad la muestra más utilizada son las heces por su sencilla obtención no invasiva. Las desventajas que tienen las heces son que no representan la totalidad de la microbiota adherida al epitelio intestinal y que las bacterias de los tramos intestinales más superiores pueden estar totalmente degradadas impidiendo su correcta detección. En algunas enfermedades, como la enfermedad inflamatoria intestinal, se pueden aprovechar las biopsias obtenidas durante las endoscopias rutinarias. La biopsia tiene la ventaja de ser una muestra más real, cuya obtención y conservación está más estandarizadas, aunque también tiene como inconvenientes su carácter invasivo, que únicamente recoge la microbiota de un punto concreto, y que los enemas de preparación del paciente para la colonoscopia pueden modificar su composición. Por todo ello, la muestra que más se utiliza son las heces en lugar de las biopsias. Otra opción es utilizar exudados rectales, que reproducen perfiles de microbiota similares a los encontrados en heces. Esta muestra se obtiene de forma sencilla y se puede conservar inmediatamente al realizarse la toma en el propio centro. Además, esta muestra se utiliza actualmente en todos los hospitales para estudio de pacientes portadores de bacterias multiresistentes a los antibióticos con buenos resultados, aunque no está asegurada la total representación de la microbiota.

5.2. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

En el caso de que la muestra sean heces, las recomendaciones son recogerlas igual que para un coprocultivo y congelarlas inmediatamente a -80°C , aunque también son aceptables temperaturas superiores (hasta -20°C). La congelación previene posibles cambios en las comunidades microbianas

hasta que se pueda realizar la extracción de ácidos nucleicos. La rapidez en la congelación es especialmente importante en el caso de que lo que se vaya a extraer sea ARN, porque se degrada fácilmente a temperatura ambiente. Las torundas rectales se pueden conservar hasta 2 horas a temperatura ambiente en un buffer estabilizador sin impacto en la composición de la microbiota.

En el caso de que la muestra elegida sean las heces, el procedimiento más habitual es que los pacientes las recojan en su casa, las conserven refrigeradas (4°C) o congeladas (-20°C) y las entreguen lo antes posible en el centro donde se van a procesar. Pueden existir factores que modifiquen los resultados finales como la contaminación durante la recogida, el tiempo hasta que se congelan, la congelación a temperaturas no muy bajas o la descongelación durante el transporte al laboratorio. Cuando la muestra permanece a temperatura ambiente se puede alterar la composición de su microbiota, por lo que se recomienda su congelación inmediata. Por otro lado, también se han descrito alteraciones de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* tras la congelación a -20°C. Una alternativa es que el paciente sumerja las heces en etanol inmediatamente tras la deposición. Posteriormente la muestra debe desecarse con sílice o directamente en el buffer de lisis para la extracción. Este es el protocolo habitualmente utilizado en el *Human Microbiome Project*. En otros estudios se ha utilizado un agente estabilizador de ácidos nucleicos, como RNAlater, especialmente diseñado para conservar las muestras cuando se va a estudiar el ARN. Sin embargo, también hay discrepancias, ya que al comparar con los resultados de muestras no tratadas y congeladas no se observa mejoría en los resultados, e incluso se ha descrito que este reactivo puede degradar el ADN. Otra posibilidad que se ha estudiado con buenos resultados es congelar la muestra en los 15 minutos siguientes a la defecación, y conservarla hasta 3 días en el congelador del domicilio. Se ha demostrado que las heces congeladas pueden sufrir hasta 4 ciclos de congelación-descongelación sin que la composición de la microbiota sufra cambios importantes.

Dependiendo de cada centro, según el tipo de muestra y del tiempo que se vayan a conservar hasta su procesamiento, será necesario elegir el método más adecuado de acuerdo a diferentes criterios, que incluyen el coste, la disponibilidad, la dificultad de uso, el tiempo requerido para su manejo, y si es compatible con otros métodos diagnósticos que se vayan a utilizar en esa misma muestra.

5.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Dentro de una misma muestra pueden existir diferentes microambientes con variaciones en la composición de su microbiota, y por ello es muy importante realizar una buena homogenización mecánica antes de comenzar el proceso de la extracción. Para solventar este problema se ha propuesto congelar la muestra completa en nitrógeno líquido convirtiéndola en polvo que puede ser homogeneizado, aunque esta tecnología no está disponible en muchos laboratorios. También es muy importante disolver completamente la alícuota que se vaya a procesar de la muestra, habitualmente 0,5 gramos de heces en 5 ml de agua, mediante agitación en vórtex o con la utilización de bolitas de vidrio.

Sin duda, el paso más crítico de todo el proceso es la extracción y purificación de los ácidos nucleicos, habitualmente ADN, ya que se necesita conseguir buena cantidad y calidad sin arrastrar sustancias que puedan inhibir las subsiguientes reacciones de PCR. Para la extracción existen diferentes protocolos comerciales y manuales con los que en general se obtienen buenos resultados.

5.4. MÉTODO DE SECUENCIACIÓN

Los comienzos de esta aproximación masiva fueron en la década de 1990 empleando métodos basados en la fragmentación del ADN o en su amplificación con cebadores universales, la clonación de estos fragmentos o amplicones en vectores comerciales, amplificación del inserto y siguiente secuenciación mediante el método de Sanger existente en aquella época (ver revisión de Handelsman 2004). Hasta los años 2004-2005 este tipo de abordaje se desarrollaba utilizando el método de Sanger, al que hoy se considera como método de primera generación.

Con el avance tecnológico en secuenciación masiva, se han desarrollado nuevos métodos que pueden secuenciar directamente el ADN fragmentado o amplificado sin necesidad de clonar. Estos métodos de secuenciación se conocen como métodos de segunda generación y se agrupan en la definición de NGS (*next generation sequencing*). Los métodos de segunda generación tienen muchas ventajas, entre ellas un menor coste, una reducción del tiempo de preparación de las librerías y del proceso de secuenciación, una aceptable calidad de los datos, y

sobre todo la generación de una gran cantidad de secuencias. Sin embargo también presentan algunas desventajas, siendo las más importantes el tamaño pequeño de las secuencias (entre 150 y 500 pares de bases), y que pueden existir errores de lectura. Por todo ello, hoy en día aún se considera al método de Sanger como el “*gold standard*” en cuanto a la calidad de las secuencias.

La secuenciación masiva con métodos de segunda generación requiere un paso previo de amplificación por PCR que puede inducir a error, sobre todo por sobreestimar a las poblaciones mayoritarias. Aun así estas técnicas representan, en la actualidad, el estándar para el estudio de las comunidades microbianas, particularmente la microbiota humana. Entre los métodos de secuenciación de segunda generación se encuentran aquellos basados en la tecnología 454 de la empresa Roche, que fue pionera y que ya está fuera del mercado. Actualmente las tecnologías más habituales disponibles son Solexa, comercializada por Illumina, e IonTorrent, comercializada por ThermoFisher.

Para poder comparar los resultados de diferentes trabajos, es importante conocer las diferentes metodologías y sus sesgos. El proceso de PCR presenta limitaciones, ya que siempre se amplifica más lo más abundante, y se desprecian las poblaciones minoritarias. Es importante también elegir bien los cebadores que se van a utilizar. Los más utilizados amplifican la región V3-V4 del gen ADNr 16S, y fueron elegidos en base a su “universalidad” para la mayoría de las especies bacterianas, aunque recientemente se ha descrito que algunas especies de bifidobacterias y bacterias lácticas no se amplifican con estos cebadores por fallos en la hibridación.

Para solucionar el problema de la mayor amplificación de las poblaciones más numerosas, se ha propuesto una amplificación clonal en micelios, de forma que cada copia de ADN se amplifique en distintos compartimentos. Por otra parte, las reacciones de PCR del gen ARNr 16S pueden generar secuencias quiméricas a partir de fragmentos de genes de distintos organismos que, por errores de la polimerasa, se mezclan y luego se amplifican. Los amplicones finales del proceso de PCR deben ser filtrados para eliminar estas quimeras, que pueden ser mal interpretadas como nuevos grupos taxonómicos durante el proceso de anotación. También hay que considerar la longitud de la secuencia obtenida, ya que si es demasiado corta no permite

obtener una identificación apropiada. Generalmente se desechan todas las secuencias con una longitud inferior a 200 pares de bases.

En el estudio de la microbiota basado en la taxonomía del gen del ARNr 16S se cuantifica la abundancia relativa de cada filo, familia, o género. Sin embargo este método presenta un inconveniente importante, ya que este gen tiene diferente número de copias en cada género o especie. Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* tiene una única copia del gen, *Helicobacter pylori* tiene 2 copias, *Staphylococcus* tiene 7 copias y finalmente *Clostridium beijerinckii* tiene 14 copias.

A pesar de los posibles sesgos y limitaciones técnicas que existen en la secuenciación masiva, estas aproximaciones moleculares son herramientas muy poderosas, que suelen ser reproducibles y permiten determinar cambios estructurales en las comunidades microbianas. Por todo ello, la secuenciación masiva de segunda generación es considerada como la mejor opción para estudiar el microbioma humano.

La tercera generación de secuenciadores ya está también en el mercado con varios equipos en desarrollo. Los grandes avances que aportan son la secuenciación directa sin paso previo de amplificación por PCR y la longitud de las secuencias obtenidas que puede llegar hasta varias kilobases. Sin embargo, una de sus desventajas es que tienen que mejorar la calidad de las secuencias que se obtienen. Entre estos métodos de tercera generación se encuentra el de PacificBioScience (PacBio) con el nuevo “Sequel System” y el Minion de Oxford Nanopore.

6. ESTRATEGIAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA

La caracterización de la microbiota puede realizarse mediante, al menos, tres tipos de abordajes:

- i) determinar la composición de los microorganismos presentes mediante la secuenciación masiva del gen ADNr 16S;
- ii) identificar las bacterias activas que se están dividiendo mediante la secuenciación masiva del ADNc originado a partir de la molécula ARNr 16S; y
- iii) analizar su actividad funcional mediante la identificación y la cuantificación de sus metabolitos. A continuación se detallan las estrategias a seguir con cada abordaje.

6.1. METATAXONOMÍA

Es la estrategia más utilizada para caracterizar la composición y la cantidad relativa de las comunidades microbianas, y su evolución en función del tiempo o de otras variables clínicas. Lo más habitual, y a la que se ha referido en el punto 5.4, suele ser a partir de una muestra de heces a la que se extrae el ADN total, se amplifica el gen ADNr 16S con cebadores universales y después se secuencian masivamente los amplicones. A cada secuencia se le asigna el grupo taxonómico mediante búsquedas en las bases de datos públicas como “Ribosomal Database Project” (RDP) y después se analizan los resultados con herramientas bioinformáticas, para validar la calidad (identidad $\geq 98\%$) y longitud (≥ 200 pb) de las secuencias. El orden habitual de análisis bioinformático incluye:

- 1) control de calidad de las secuencias;
- 2) eliminación de secuencias quiméricas;
- 3) agrupamiento de las secuencias por características de similitud y solapamiento (clustering);
- 4) asignación taxonómica, y
- 5) análisis estadístico para determinar las diferencias significativas.

En general, el proceso completo de secuenciación masiva suele quedar a cargo de los servicios de secuenciación, debido a la alta especialización técnica necesaria y a la limitación de la disponibilidad de los aparatos que se requieren para esta metodología. En estas unidades se ofertan los conocimientos y habilidades necesarios para llevar a cabo la construcción de las librerías y la secuenciación de acuerdo con los estándares de cada tecnología elegida. A pesar de que el procesamiento final de los datos suele correr a cargo de un experto en bioinformática, siempre es necesario atribuir un sentido biológico y microbiológico a los resultados.

6.2. METATAXONOMÍA DE LA FRACCIÓN ACTIVA

Los estudios de metataxonomía basados en análisis de ADN permiten conocer la composición de la microbiota sin diferenciar entre las bacterias vivas y las muertas, latentes o inactivas. La información funcional de las bacterias también es importante, ya que puede incidir directa o indirectamente en nuestra salud. Para poder identificar a las bacterias activas es necesario extraer el ARN de la muestra, transformarlo en ADNc mediante retrotranscripción, y finalmente

secuenciarlo. De esta forma solo se identifican las bacterias que se están dividiendo. Las técnicas y tecnologías para el estudio son las mismas que en el caso de la metataxonomía, salvo que en este caso el material de partida es la molécula de ARNr 16S.

La diferencia de información que se obtiene utilizando uno u otro tipo de análisis (gen ADNr 16S o molécula ARNr 16S) queda reflejado en el siguiente ejemplo. El tratamiento con antibióticos beta-lactámicos y fluoroquinolonas se asocia con una estimulación metabólica, y por tanto a altos niveles de transcripción en los géneros *Shewanella*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eggerthella*, *Enhydrobacter*, *Halomonas*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, y *Granulicatella*. Sin embargo este hecho no se aprecia cuando se analiza la presencia de dichos genes usando ADN total (gen ADNr 16S). Esto demuestra el potencial del análisis a partir de la molécula de ARN para definir claramente que bacterias reaccionan más fuertemente frente a los estímulos externos y locales. Los resultados que se pueden obtener empleando esta estrategia están en relación con:

- i) qué factores inducen mayores niveles de transcripción o activación,
- ii) qué porcentaje y tipo de bacterias de la microbiota se activan,
- iii) si hay grupos de bacterias que son más sensibles a las perturbaciones, etc.

Antes de evaluar cuáles son las bacterias que responden de forma activa frente a los estímulos, es importante también identificar cuáles son las bacterias más activas en una persona sana. Los estudios recientes han revelado que habitualmente las bacterias del filo *Bacteroidetes* están latentes o inactivas, mientras que todas las bacterias del filo *Firmicutes*, particularmente *Lachnospiraceae*, son muy activas.

Dicho esto, se ha considerado también el espectro de bacterias activas en la microbiota en respuesta a enfermedades como el autismo, la enfermedad de Crohn, diarrea, enfermedades intestinales, VIH, asma, enfermedad periodontal, caries, exposición a productos químicos, tratamientos antibióticos, o diferentes dietas, entre las más significativas. En líneas generales, se ha observado que los niveles de activación son mayores en las siguientes familias: *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Eggerthellaceae* y *Propionibacteriaceae* (*Actinobacteria*); *Bacteroidaceae*, *Odoribacteraceae*, *Porphyromona-*

daceae y Prevotellaceae (Bacteroidetes); Acidaminococcaceae, Lachnospiraceae, Clostridiaceae, Enterococcaceae, Eubacteriaceae, Ruminococcaceae, Carnobacteriaceae, Lactobacillaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae y Veillonellaceae (Firmicutes); Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Neisseriaceae, Pseudomonadaceae, Burkholderiaceae y Shewanellaceae (Proteobacteria); Fusobacteriaceae (Fusobacteria); Akkermansiaceae (Verrucomicrobia), Rickenellaceae (hongo); y Methanobacteriaceae (arquea).

6.3. METAGENÓMICA

Una de las preguntas que habitualmente surgen al analizar la microbiota en función de los factores externos, es hasta qué punto los cambios en su composición se traducen en cambios metabólicos. En este sentido, se ha demostrado que la introducción de una bacteria probiótica en el tracto gastrointestinal humano altera de manera significativa el metabolismo global de la microbiota. Por tanto, es posible pensar que pequeñas alternaciones en la composición pueden ocasionar graves consecuencias metabólicas. Sin embargo, la mera presencia o cambios en la abundancia de una bacteria no siempre se relacionan con una respuesta metabólica global. Además, esta relación entre composición y metabolismo está fuertemente influenciada por la plasticidad metabólica (también denominada resistencia) y la redundancia funcional. Una microbiota es resiliente si su composición no cambia frente a una perturbación, y esto es posible gracias a la redundancia en las actividades metabólicas que se pueden compartir entre bacterias de diferentes especies. Esta redundancia funcional es habitual en las comunidades microbianas, y consiste en que distintas especies pueden comportarse metabólicamente de la misma forma; por lo tanto, bacterias diferentes pueden comportarse de manera similar desde un punto de vista de la actividad que poseen. Por esta razón es esencial evitar inferir consecuencias metabólicas exclusivamente a partir de los datos taxonómicos, independientemente de que estos datos sean de microorganismos activos (mediante análisis de la molécula ARNr 16S), o muertos, latentes o inactivos (mediante análisis del gen ADNr 16S), dado que diferentes grupos taxonómicos pueden ser metabólicamente equivalentes.

Para solventar este problema se han empezado a aplicar estudios de metagenómica y metatranscriptómica basados en la secuenciación masiva de ADN o ARN (o ADNc) para estudiar cómo las alteraciones

en la composición microbiana influyen en el contenido de genes y la expresión de los mismos. Este

método, desarrollado en los años 1980 y 1990 es conocido como “shot-gun” y permite leer las secuencias de fragmentos de ADN o ARN sin amplificación previa. Es un método que requiere una mayor computación de los datos y eso suele encarecer el proceso. El conjunto de todos estos fragmentos se considera representativo del conjunto de los genomas bacterianos presentes en la microbiota original.

Hoy en día la metagenómica es una disciplina básica para el estudio de las comunidades microbianas desde un punto de vista fisiológico y funcional. Gracias a la secuenciación masiva y al análisis bioinformático se pueden llegar a conocer las rutas metabólicas y las funciones llevadas a cabo por las bacterias mediante análisis comparado entre los fragmentos de ADN secuenciados y las bases de datos. Además de la información funcional, con el incremento de las bases de datos y la mejora de las informaciones contenidas, la metagenómica proporciona también datos taxonómicos siempre más fiables. Con esta estrategia se obtiene información genética sobre potenciales nuevos biocatalizadores, enzimas, relaciones genómicas entre organismos distintos y su filogenia, perfiles evolutivos, etc.

La secuenciación de metagenomas permite obviar el importante sesgo introducido por el proceso de PCR, ya que los fragmentos obtenidos se seleccionan al azar sobre el total de los genomas presentes en la muestra original. Aun así los resultados pueden estar influenciados por el número de copias de cada uno de los genes, incluido el gen ADNr 16S, que es variable en cada especie. Este abordaje proporciona una visión más fidedigna de la distribución taxonómica real de los microorganismos. Para una revisión sobre los protocolos aplicados en metagenómica se sugiere la revisión por Thomas *et al.*, (2012). Los pasos bioinformáticos básicos para analizar muestras metagenómica se pueden resumir en:

- 1) control de calidad;
- 2) ensamblaje de las lecturas obtenidas;
- 3) anotación sin ensamblar (pasos 1, 3);
- 4) anotación de las lecturas que corresponden a las regiones continuas del genoma identificadas (conocidos como contigs ensamblados) (pasos 1, 2, 4); y finalmente

5) caracterización taxonómica de las lecturas o contigs.

6.4. METABOLÓMICA

Las estrategias para el estudio de la composición de la microbiota (metataxonomía), de los genes que contiene (metagenómica), de la expresión de genes (metatranscriptómica) y de la síntesis de proteínas (metaproteómica), se han complementado en los últimos años con la incorporación de la metabolómica. Esta estrategia aborda la identificación y caracterización de los metabolitos desde un punto de vista funcional. La determinación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos se considera como uno de los mejores marcadores de la actividad microbiana, ya que son el producto final de una reacción metabólica independientemente de que microorganismos o que número de enzimas participan en ella.

Mientras que existen métodos estandarizados para el procesamiento de las muestras (por ejemplo, heces) y los posteriores análisis metataxonómicos y metagenómicos (y también metatranscriptómicos), los análisis metabolómicos están muy lejos de un desarrollo óptimo y de lograr una estandarización universal, especialmente en la intestinal, que es la de mayor interés.

El análisis metabólico de una muestra como son las heces se complica mucho ya que no sólo contiene los productos metabólicos de los microorganismos y de las células epiteliales, sino que también recibe un flujo constante de sustancias con la ingesta de alimentos. A continuación se detallan varias consideraciones sobre el análisis de metabolitos en muestras de heces y se describe un método sencillo para la extracción de los mismos.

Desde un punto de vista de química analítica, para el análisis de metabolomas se requieren dos tipos de herramientas: la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS). Además, independientemente de las técnicas, hay dos tipos de enfoque en metabolómica:

- i) dirigido y
- ii) no dirigido, según se conozca o no la naturaleza del metabolito que se quiere identificar y/o cuantificar.

Estudiar los metabolitos de la microbiota y su relevancia biológica no está restringido al ecosistema

intestinal. De hecho se pueden estudiar metabolitos asociados a actividad microbiana en orina o plasma. Sin embargo, entender el metabolismo de las bacterias en el intestino y su influencia en la salud, sigue siendo una de las asignaturas pendientes más importantes. Recientemente se han desarrollado métodos para la extracción de metabolitos de bacterias adheridas a tejidos obtenidos mediante biopsia, pero su obtención requiere métodos invasivos, por lo que las heces suelen ser el material habitual para el estudio metabólico de la microbiota intestinal.

Los pasos a seguir a partir de la muestra de heces para analizar los metabolitos intracelulares de las bacterias son:

- i) un pre-fraccionamiento de la muestra para separar las bacterias;
- ii) una lisis celular;
- iii) el análisis de los perfiles metabolómicos mediante espectrometría de masas de última generación; y
- iv) finalmente un análisis comparativo de los datos obtenidos.

En las heces también se pueden analizar y cuantificar los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), originados en la fermentación bacteriana de los carbohidratos complejos de la dieta (fibra y almidón). Los principales AGCC que se detectan en las heces son el acético, el propiónico y el butírico (>90% de todos los AGCC), pero también hay otros ramificados, el ácido isobutírico y el ácido isovalérico que son minoritarios (representan en torno al 5% del total) y derivan principalmente del metabolismo de proteínas y aminoácidos, estando menos estudiados en general que los mayoritarios.

La mayor parte de los AGCC producidos en el colon se absorben en la mucosa colónica mediante difusión y transportadores específicos. Mientras que el epitelio del colon consume casi por completo el butírico, el cual constituye la principal fuente de energía para los colonocitos, el acético y el propiónico pasan a la circulación portal y se utilizan como precursores en el hígado o en los tejidos periféricos para la gluconeogénesis hepática y la lipogénesis. Los AGCC tienen una gran importancia en la fisiología y nutrición del tracto gastrointestinal, presentando propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas. Así, el butírico se ha relacionado con la reversión de células neoplásicas, pudiendo participar en la prevención de procesos cancerígenos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014; 6:237ra65.
2. Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The human gut microbiome in health and disease. *Integrative Medicine* 2014; 13:17-22.
3. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96:544-51.
4. Cani PD, Knauf C. How gut microbes talk to organs: the role of endocrine and nervous routes. *Mol Metab.* 2016; 5:743-52.
5. Cho I, Martin J, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012; 13:260-70.
6. Delgado S, García-Garrote F, Padilla B, Rodríguez JM, Romero B. Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y puerperio. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, nº54. Padilla B. (Coordinadora). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.
7. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, Kim CJ, Erez O, Edwin S, Relman DA. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 2008; 3:e3056.
8. Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 2013; 36:305-12.
9. García-Fernández S, Morosini MI, Cobo M, Foruny JR, López-Sanromán A, Cobo J, Romero J, Cantón R, Del Campo R. Gut eradication of VIM-1 producing ST9 *Klebsiella oxytoca* after fecal microbiota transplantation for diarrhea caused by a *Clostridium difficile* hypervirulent R027 strain. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016; 86:470-1.
10. Hamilton MJ, Weingarden AR, Unno T, Khoruts A, Sadowsky MJ. High-throughput DNA sequence analysis reveals stable engraftment of gut microbiota following transplantation of previously frozen fecal bacteria. *Gut Microbes* 2013; 4:125-35.
11. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 4:669-85.
12. Hevia A, Delgado S, Margolles A, Sánchez B. Application of density gradient for the isolation of the fecal microbial stool component and the potential use thereof. *Sci Rep.* 2015; 5:16807.
13. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013; 1:e1.
14. Logares R, Sunagawa S, Salazar G, Cornejo-Castillo FM, Ferrera I, Sarmiento H, Hingamp P, Ogata H, de Vargas C, Lima-Mendez G, Raes J, Poulain J, Jaillon O, Wincker P, Kandels-Lewis S, Karsenti E, Bork P, Acinas SG. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environ Microbiol.* 2014; 9:2659-71.
15. Martín R, Escobedo S, Martín C, Suárez E. La vagina y su microbiota. En: *Probióticos, prebióticos y salud: evidencia científica*. Eds. Álvarez-Calatayud G, Marcos A, Margolles A. Capítulo 4. Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP). 2016. ISBN: 978-84-16732-09-8.
16. Prince AL, Chu DM, Seferovic MD, Antony KM, Ma J, Aagaard KM. The perinatal microbiome and pregnancy: moving beyond the vaginal microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 5:pil0023051.
17. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (Suppl 1):4680-7.
18. Rogers GB, Keating DJ, Young RL, Wong ML, Licinio J, Wesselingh S. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol Psychiatry.* 2016; 21:738-48.
19. Sangster W, Hegarty JP, Schieffer KM, Wright JR, Hackman J, Toole DR, Lamendella R, Stewart DB. Bacterial and fungal microbiota changes distinguish *C. difficile* infection from other forms of diarrhea: results of a prospective inpatient study. *Front Microbiol.* 2016; 7:789.
20. Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PLoS One* 2014; 8:e105592.
21. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp.* 2012; 1:3.
22. Wang S, Xu M, Wang W, Cao X, Piao M, Khan S, Yan F, Cao H, Wang B. Systematic review: adverse events of fecal microbiota transplantation. *PLoS One.* 2016; 11(8):e0161174.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de sus metabolitos en heces mediante técnicas de metabolómica	PNT-MB-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 8

PNT-MB-01

Detección e identificación de metabolitos bacterianos en heces mediante técnicas de metabolómica

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de sus metabolitos en heces mediante técnicas de metabolómica	PNT-MB-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describen los métodos necesarios para extraer y analizar los metabolitos intracelulares de las bacterias intestinales en tres pasos:

- i) un pre-fraccionamiento de las heces para separar las bacterias;
- ii) una extracción de los metabolitos de dichas bacterias; y
- iii) el análisis de los metabolitos extraídos mediante técnicas analíticas. El protocolo que se desarrolla a continuación se refiere exclusivamente a la extracción de los metabolitos intracelulares de las bacterias de las heces, aunque también se ha incluido un apartado con la metodología necesaria para identificar los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son extracelulares y volátiles.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología en los que se vaya a realizar la detección de metabolitos de bacterias en heces.

2. FUNDAMENTO

Mediante el análisis de los metabolitos intracelulares de las bacterias intestinales se pueden describir alteraciones metabólicas independientemente de la composición de la microbiota. El estudio de metabolitos y su relevancia biológica se puede realizar en heces y también en orina o en plasma, y recientemente se han desarrollado métodos para extraer los metabolitos de las bacterias adheridas a tejidos obtenidos mediante biopsia. Sin embargo, estas muestras requieren métodos invasivos, por lo que las heces continúan siendo la muestra más utilizada en la metabolómica intestinal.

La metabolómica proporciona el perfil metabólico global de la microbiota de un individuo en tiempo real, pero también puede realizarse un análisis computacional de los espectros a lo largo del tiempo. Con este enfoque, es posible dilucidar vías y redes complejas, que pueden estar alterados en enfermedades concretas. La combinación de los perfiles metabólicos y la metagenómica permite conocer el metabolismo tanto del hospedador como de la microbiota. Al análisis funcional de los componentes de la microbiota, que afectan al metabolismo y a la salud humana, se le conoce como la metagenómica funcional.

El material fecal es muy complejo desde un punto de vista biológico pero también químico y la extracción de metabolitos puede originar mezclas complejas de origen indeterminado. Las heces no solo contienen los metabolitos de las bacterias, sino también alimentos, y metabolitos excretados por las células epiteliales humanas. Es por ello que para analizar el metabolismo bacteriano es necesario estudiar aquellos metabolitos que permanecen intracelulares.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Pérez Saénz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de sus metabolitos en heces mediante técnicas de metabolómica	PNT-MB-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se recogerá una muestra de heces utilizando contenedores estériles de coprocultivo que será homogeneizada mecánicamente antes del alicotado. Se necesitan 0,4-1,0 g de heces, aunque siempre es recomendable partir de cantidades mayores para asegurar una mayor representación de los metabolitos minoritarios.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras, sin añadir conservantes ni aditivos, serán transportadas al laboratorio donde se va a realizar la separación de las bacterias y la extracción de metabolitos de dichas bacterias. Las muestras se pueden mantener a 4°C si se van a procesar antes de las 24 horas, o se pueden conservar congeladas a -20°C o -80°C.

El rendimiento de la separación de bacterias y la extracción de metabolitos no depende de la temperatura de conservación, sin embargo dado que la actividad de las bacterias presentes en las heces continúa en las muestras, se recomienda que las muestras se conserven y transporten al menos a 4°C. Los laboratorios que reciben y almacenan las heces deben mantener un sistema de recepción y registro de muestras controlado para evitar errores.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Al ser muestras de fácil obtención sólo se rechazarán cuando estén mal identificadas o la cantidad de material sea insuficiente. Cuando se registren otros tipos de incidencias como una conservación inadecuada (temperatura inapropiada) se hará constar la incidencia producida en el informe de resultados: "Interpretar los resultados con precaución: muestra recibida en condiciones defectuosas".

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. PRE-TRATAMIENTO DE LAS HECES

- Agua estéril, preferiblemente grado milliQ.
- Solución salina estéril (0,9% de cloruro sódico [NaCl]).

5.2. PRE-TRATAMIENTO DE LAS HECES

- Metanol grado cromatográfico frío (mantenido a -20°C durante al menos 24 horas antes de la extracción).
- Agua estéril, preferiblemente grado milliQ, mantenida a 4°C durante al menos 24 horas antes de la extracción

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de sus metabolitos en heces mediante técnicas de metabolómica	PNT-MB-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1 PARA LA RECOGIDA DE LA MUESTRA

- Contenedores estériles.
- Micropipetas (para volúmenes de hasta 1 ml).
- Puntas de micropipeta de “calidad molecular” con filtro.
- Gradillas para tubos sarstedt o similares.
- Tubos de microcentrífuga de tipo Eppendorf de 2 ml.
- Bandeja con hielo.
- Gradilla para tubos de microcentrífuga de 2 ml.
- Contenedores de residuos.
- Cabina de seguridad biológica.
- Agitador tipo vórtex.
- Sonicador de punta (Sonicator® 3000; Misonix).
- Microcentrífuga.
- Balanza.

6.2 PROTOCOLOS DE ANÁLISIS DE METABOLITOS

Desde un punto de vista de química analítica para el análisis de metabolitos se requieren dos tipos de herramientas: resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS). Independientemente de las técnicas a emplear, hay dos tipos de enfoque en el análisis de metabolitos: dirigido y no dirigido. El primero de ellos corresponde al objetivo típico de la química analítica clásica donde se quiere cuantificar un metabolito o analito de interés. El segundo se basa en un análisis más flexible en el que lo que se quiere evaluar es la presencia de un amplio número de metabolitos cuya naturaleza *a priori* no se conoce. Sin entrar en detalle de las diferencias y similitudes de las técnicas (RMN y MS) y enfoques (dirigido o no dirigido), hay que mencionar que se pueden usar cualquiera de estas técnicas de análisis en combinación con técnicas cromatográficas tales como cromatografía líquida, cromatografía de gases y electroforesis capilar.

6.3 PROTOCOLOS DE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS

- Molecular Feature Extraction tool in the Mass Hunter Qualitative Analysis software (B.06.00, Agilent).
- Mass Profiler Professional software (version 13.0, Agilent).
- SIMCA-P+ software (12.0.1.0, Umetrics).
- Mass Mediator search tool (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>)
- MS/MS spectra in a public database (METLIN: https://metlin.scripps.edu/metabolites_list.php)

7. PROCEDIMIENTO

Se realizarán dos etapas de extracción para conseguir aislar la mayor variedad de metabolitos, tanto apolares (con metanol), como polares (con agua).

Distribución de áreas de trabajo

- Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos y análisis químico.
- Área 2 de manipulación de muestras y extracción de metabolitos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de sus metabolitos en heces mediante técnicas de metabolómica	PNT-MB-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

7.1 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

7.1.1 Preparación de las muestras

- Las muestras se deben procesar en el área 2 del laboratorio de Diagnóstico Molecular en campana de bioseguridad.
- Todas las muestras se deben atemperar antes de su procesamiento. Las muestras de heces mantenidas a 4°C se pueden procesar directamente, mientras que las muestras congeladas a -20°C o -80°C, se deben descongelar y atemperar. La descongelación de las muestras se realizará de manera gradual durante 2 horas a 4°C para minimizar la posible pérdida de los grupos bacterianos y sus metabolitos más sensibles a los cambios de temperatura. Una vez descongeladas el tratamiento de las muestras debe realizarse en hielo.
- En el área 2 del laboratorio de Diagnóstico Molecular y en campana de bioseguridad, se pesan 0,4 g de heces en un tubo de microcentrifuga de 2 ml.

7.1.2. Separación de bacterias de heces

- Añadir 1,2 ml de agua destilada o solución salina estéril (1:3 peso/volumen heces) y agitar en un mezclador de vórtice durante 10 segundos a 1.000 rpm hasta conseguir la total homogenización.
- Las muestras se centrifugarán a 4°C a 2.000 g en una microcentrifuga a 4°C durante 2 minutos para eliminar los restos de heces y sedimentar los restos de fibra.
- El sobrenadante se transferirá a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml y se centrifugará a 13.000 g a 4°C durante 15 minutos para separar las bacterias.
- El sobrenadante se eliminará y el pellet bacteriano se resuspenderá nuevamente en 1,2 ml de agua destilada o tampón fosfato salino estéril.
- Se repetirán los pasos anteriores 2 veces, eliminando en cada paso el sobrenadante.
- El pellet de bacterias resultante se procesará inmediatamente o se mantendrá a -20°C hasta su uso.

7.2 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS MICROBIANOS

- El pellet de bacterias se resuspende en 1,2 ml de agua destilada o tampón fosfato salino estéril e inmediatamente se agita en un mezclador de vórtice durante 10 segundos. La suspensión se separará en dos tubos de microcentrifuga de 2 ml, cada uno conteniendo 0,6 ml de la suspensión de bacterias, y la muestra se centrifuga a 13.000 g a 4°C durante 15 minutos para separar las bacterias.
- Una de las alícuotas se resuspenderá en 1,2 ml de metanol grado cromatográfico frío (a -20°C) y la otra alícuota en 1,2 ml de H₂O fría (a 4°C en un baño de hielo). El proceso de extracción para ambas alícuotas es igual.
- Agitar en un mezclador de vórtice durante 10 segundos a 1.000 rpm.
- Sonicar cada una de las mezclas por separado manteniendo cada uno de los tubos en un baño con hielo con un sonicador de punta (Sonicator® 3000; Misonix) a una potencia de 10 W. Se realizarán 3 ciclos de 30 segundos cada uno, manteniendo la muestra en hielo durante 1 minuto entre ciclos. En caso de que no se disponga de un sonicador de punta se puede usar un aparato de ultrasonidos lleno de agua con hielo, si bien en este caso se realizan ciclos de 30 minutos cada uno.
- Centrifugar la muestra a 4°C a 13.000 g durante 15 minutos para eliminar los restos de bacterias.
- Se transferirá el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml que posteriormente se conserva a -20°C, eliminado el pellet.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de sus metabolitos en heces mediante técnicas de metabolómica	PNT-MB-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

7.3 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE METABOLITOS

- Mezclar en un tubo de microcentrífuga de 2 ml 0,5 ml de la solución metanólica y 0,5 ml de la solución acuosa obtenidas en el paso anterior. Si las muestras estaban congeladas a -80°C (la solución acuosa, ya que la solución metanólica no se congela), se deben descongelar primero depositándolas en un baño de hielo.
- La mezcla resultante se filtrará ($0,22\ \mu\text{m}$) para someterla a análisis de cromatografía y espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear.

7.4 ANÁLISIS QUÍMICO

La mezcla de metabolitos se transportará a una Unidad Central de Análisis Químico y se rellenará el formulario de solicitud de análisis. Los métodos comúnmente utilizados para determinar los perfiles de metabolitos en heces (y también en suero) incluyen procedimientos tales como resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM), cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa de tiempo de vuelo (CG-EMTOF). Es importante utilizar controles de calidad biológicos y comprobar la validez de los datos que se obtienen de las técnicas basadas en CG-EM. Los estudios de metabolómica basados en CG-EM incluyen varios pasos, como corrección de línea de base, reducción de ruido, resolución, cálculo del área de pico, y alineación de tiempo de retención, medidas que ayudan a generar datos coherentes.

7.5 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC)

Entre el amplio rango de metabolitos que produce la microbiota intestinal, destacan los AGCC por su importancia en la fisiología y nutrición del ser humano. Son ácidos grasos volátiles compuestos por no más de 6 carbonos que pueden tener conformación ramificada o no. El acético (C2), propiónico (C3) y butírico (C4) son los más abundantes representando más del 90% de los AGCC presentes en el colon.

Se pueden detectar y cuantificar mediante técnicas de cromatografía líquida y gaseosa, por su naturaleza volátil, especialmente el ácido acético, por lo que se recomienda el empleo de cromatografía de gases (CG). Metodológicamente, para su determinación, no es necesario extraer o separar la microbiota y los AGCC se pueden analizar directamente en las aguas fecales (dilución acuosa de heces); si bien, el tratamiento con solventes orgánicos y posterior centrifugación y filtración de las muestras facilita su análisis en el sistema cromatográfico (al inyectarse la muestra con menos impurezas y obtenerse cromatogramas más limpios). Uno de los protocolos más usados es la acidificación con ácido fórmico al 20% y su posterior tratamiento con metanol, previa adición del estándar interno (por ejemplo, 2-etil-butírico). La detección y cuantificación se puede llevar a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Tangerman y Nagengast (1996) usando un cromatógrafo de gases con un detector de llama (FID) y realizando la calibración del equipo con un mínimo de cinco concentraciones diferentes de soluciones acuosas de los AGCC. Si no se pueden analizar las muestras de heces tras su recogida, es recomendable conservar congelados los sobrenadantes (con el estándar interno ya incluido) hasta su análisis posterior.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de sus metabolitos en heces mediante técnicas de metabolómica	PNT-MB-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

8. OBTENCIÓN, ANÁLISIS DE RESULTADOS E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS

8.1 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Los resultados obtenidos para cada muestra se introducirán en un programa informático y serán validados por el responsable de análisis químico. Existen varios tipos de software disponibles en el mercado que pueden ayudar en las estrategias de corrección de los resultados, previo al análisis de datos. Los análisis de alto rendimiento mediante espectroscopía de RMN o espectrometría de masas (EM) proporcionan información metabólica global sobre el metabolismo humano. Acoplado con el análisis computacional multivariado, estos métodos proporcionan una comprensión más profunda de estados de enfermedad y pueden conducir al descubrimiento de nuevos biomarcadores. Este enfoque facilita la cuantificación de influencias ambientales en el genoma del huésped y la salud humana.

Los datos se tratan con la herramienta “*Molecular Feature Extraction*” del software “*Mass Hunter Qualitative Analysis software (B.06.00, Agilent)*”. A continuación los datos son alineados con el software “*Mass Profiler Professional software (version 13.0, Agilent)*”. Se realizan modelos en los que el tipo y abundancia de metabolitos se evalúa usando el software “*SIMCA-P+ software (12.0.1.0, Umetrics)*”. A continuación se aplica un test estadístico “*Mann-Whitney U*” seguido de una corrección “*Benjamini-Hochberg ($p \leq 0,05$)*” para identificar metabolitos diferenciales entre muestras.

8.2 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS

Los resultados obtenidos se tratan con la herramienta “*Mass Mediator search tool* (<http://biolab.uspceu.com/mediator>; error ± 5 Da)” y “*MS/MS spectra*” de las bases de datos públicas (METLIN: https://metlin.scripps.edu/metabolites_list.php)” para generar un listado de posibles identificaciones. Se obtiene un porcentaje de error en partes por millón (ppm). Las identificaciones con desviaciones por debajo de 5 ppm se consideran adecuadas. Las identificaciones deben estar limpias, sin mostrar indeterminaciones. En caso de que se detecten distintos metabolitos asociados a una misma masa con secuencias mixtas, se informará como metabolito indeterminado. En el caso de que no haya en las bases de datos ningún metabolito asociado a la masa detectada se informará como metabolito desconocido.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología y de Análisis que los emite.

La toma de muestra, el transporte y la conservación debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene, así como las normas de trabajo en laboratorios de Microbiología. Todas las manipulaciones deben realizarse con guantes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de sus metabolitos en heces mediante técnicas de metabolómica	PNT-MB-01	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

Es importante considerar que para la obtención de resultados correctos en un laboratorio de Diagnóstico Molecular, se debe distribuir el trabajo en 2 áreas perfectamente diferenciadas:

Área 1 o zona limpia: dedicada al análisis de las muestras. En la que solo se manejarán las muestras de metabolitos ya extraídas. En esta área se analizan las muestras.

Área 2 o de manipulación de muestras y extracción de metabolitos. En esta área se procesan las muestras y se realiza la extracción de metabolitos.

En cada zona de trabajo debe existir material independiente (puntas de micropipeta, micropipetas, guantes, etc.). No se debe trasladar el material de una zona a otra, salvo el estrictamente necesario.

Es importante que para el manejo del material que esté en contacto con agentes intercalantes, se usen siempre guantes y se extremen las precauciones de seguridad, ya que son reactivos tóxicos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El resultado final depende en gran medida de la cantidad y calidad de la muestra remitida y los resultados de los análisis químicos pueden depender de la conservación de la muestra en hielo durante el proceso de extracción.

Los resultados de la metabolómica pueden ser complejos, debido a que el ambiente químico asociado con los metabolitos endógenos es muy diverso, y por lo tanto es difícil de descifrar por completo. Las tecnologías comunes de análisis utilizados en metabolómica incluyen espectroscopía de RMN, CL-EM y CG-EM, así como CG-EMTOF. Estas técnicas analíticas diferentes tienen sus propias fortalezas y debilidades y se utilizan generalmente de forma integrada para proporcionar datos complementarios. La selección de una técnica analítica en particular depende de las preguntas planteadas para el estudio. La RMN tiene la ventaja de ser rápida, no destruye las muestras, y es aplicable a los biomateriales intactos ricos en información química estructural. Además, requiere una preparación mínima de la muestra y se puede utilizar para investigar una mezcla o diferentes metabolitos en una sola muestra. Sin embargo, la EM tiene las ventajas de una mayor sensibilidad, exactitud, precisión y reproducibilidad. Además, el acoplamiento de CG a EMTOF ofrece varias ventajas adicionales, tales como análisis en tiempo reducido y mayor precisión con respecto a la resolución de picos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Moya A, Ferrer M. Functional redundancy-induced stability of gut microbiota subjected to disturbance. *Trends Microbiol* 2016; 24:402-13.
2. Rojo D, Gosalbes MJ, Ferrari R, Pérez-Cobas AE, Hernández E, Oltra R, Buesa J, Latorre A, Barbas C, Ferrer M, Moya A. *Clostridium difficile* heterogeneously impacts intestinal community architecture but drives stable metabolome responses. *ISME J* 2015; 9:2206-20.
3. Rojo D, Hevia A, Bargiela R, López P, Cuervo A, González S, Suárez A, Sánchez B, Martínez-Martínez M, Milani C, Ventura M, Barbas C, Moya A, Suárez A, Margolles A, Ferrer M. Ranking the impact of human health disorders on gut metabolism: systemic lupus erythematosus and obesity as study cases. *Sci Rep* 2015; 5:8310.
4. Serrano-Villar S, Rojo D, Martínez-Martínez M, Deusch S, Vázquez-Castellanos JF, Bargiela R, Sainz T, Vera M, Moreno S, Estrada V, Gosalbes MJ, Latorre A, Seifert J, Barbas C, Moya A, Ferrer M. Gut bacteria metabolism impacts immune recovery in HIV-infected individuals. *EBioMedicine* 2016; 8:203-16.
5. Tangerman A, Nagengast FM. A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. *Anal Biochem* 1996; 236:1-8.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 11

PNT-MB-02

Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 11

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describe la metodología a seguir para determinar la composición de la microbiota intestinal mediante amplificación del gen que codifica la subunidad 16S del ribosoma bacteriano (gen ADNr 16S), su secuenciación masiva y la asignación taxonómica de las secuencias obtenidas (metataxonómica).

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología donde se analicen muestras de heces para el estudio de la microbiota intestinal.

2. FUNDAMENTO

La microbiota intestinal está formada por un gran número de microorganismos, siendo mayoritarias las bacterias, pero también se pueden encontrar hongos, virus y arqueas. La mayoría de las bacterias de este ecosistema son difíciles de cultivar, y aunque fuera posible, el estudio de la microbiota mediante cultivo sería muy laborioso. Por ello se han desarrollado diferentes técnicas, basadas en secuenciación de alto rendimiento o de nueva generación, que permiten identificar los microorganismos de la microbiota intestinal en base a sus secuencias genómicas.

La aproximación más frecuente para estudiar este ecosistema se basa en una extracción del ADN de todos los microorganismos de las heces, una amplificación del gen ADNr 16S, la secuenciación de los productos amplificados, la agrupación de las secuencias obtenidas por similitud entre ellas y la realización de una clasificación taxonómica para conocer la abundancia relativa de cada bacteria. El análisis se puede realizar a nivel de filo, clase, orden, familia o género. Dependiendo de la metodología empleada y la longitud del fragmento secuenciado, el análisis puede hacerse con exactitud hasta nivel de género o superiores.

Al gen ADNr 16S se le considera un cronómetro evolutivo, ya que está muy conservado en todas las bacterias y hoy en día se utiliza de forma universal en la identificación taxonómica. Su estructura secundaria está muy conservada a lo largo de la evolución, presentando regiones espaciadoras variables que pueden acumular cambios pero muy lentamente. En estas zonas existe suficiente variabilidad como para diferenciar bacterias filogenéticamente próximas. El tamaño completo del gen es de \approx 1.500 pb. Existen bases de datos de secuencias de este gen, de acceso libre, disponibles para comparar con los resultados obtenidos en cada análisis.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Pérez Saénz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E . Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 11

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra de heces es la que se utiliza con mayor frecuencia para el estudio de la microbiota intestinal. También se pueden utilizar exudados rectales o incluso biopsias obtenidas mediante endoscopia. El procedimiento para obtención de estas muestras se debe realizar siguiendo la metodología habitual (Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003).

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras se recogerán en contenedores estériles de acuerdo con Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003 y se entregarán en el laboratorio. Si la muestra no se va a procesar de forma inmediata se añadirá conservante o estabilizador de ADN o ARN según el estudio a realizar y se congelarán a -80°C de acuerdo con las instrucciones del fabricante del reactivo estabilizante.

Si la muestra no se puede enviar al laboratorio de forma inmediata, el paciente puede recoger la muestra y congelarla en los 15 minutos siguientes a la defecación (se puede conservar hasta 3 días en el congelador del domicilio). La muestra se entregará en el laboratorio teniendo en cuenta que puede sufrir hasta 4 ciclos de congelación-descongelación sin que el microbioma sufra cambios importantes.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se rechazarán las muestras que se encuentren mal identificadas o aquellas que presenten el contenedor abierto o roto, así como las que presenten señales de mala conservación.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se pueden utilizar sistemas comerciales de extracción de ácidos nucleicos manuales o automáticos siempre que permitan el uso de muestras de heces. Se utilizará un procedimiento de extracción que asegure la ruptura de la pared bacteriana de todas las bacterias, incluidas aquellas cuya pared es más resistente a la lisis, generalmente con un tratamiento previo con bolitas de vidrio, o la incubación con lisozima o lisostafina.

5.2. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

Para el estudio taxonómico basado en el gen ADNr 16S se pueden utilizar diferentes regiones del gen, aunque sin duda la más utilizada es la región V3-V4. El ADN extraído se puede enviar a los centros especializados en secuenciación, donde se realiza tanto la amplificación como la creación de librerías y la secuenciación.

5.3. DETECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE AMPLICONES

En el caso de que estos procedimientos se realicen en el propio centro se utilizarán geles de agarosa para comprobar la amplificación y sistemas comerciales para la purificación de amplicones, antes de enviar las muestras para su secuenciación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 11

5.4. SECUENCIACIÓN

Se pueden utilizar diferentes plataformas disponibles de secuenciación masiva o de alto rendimiento. Actualmente las más utilizadas son la tecnología de Solexa, comercializada por Illumina y la de IonTorrent, comercializada por ThermoFisher. Ya se encuentran disponibles sistemas de tercera generación como Pacific Biocience (PacBio) y Minilon de Oxford Nanopore, con la ventaja de que se puede secuenciar el ADN de forma directa sin amplificación previa y permite secuenciar fragmentos de hasta varias kilobases. Sin embargo, actualmente la calidad de las secuencias que obtienen es media y debe mejorarse.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica.
- Agitador tipo vórtex.
- Termocicladores y sus accesorios.
- Microcentrífugas.
- Micropipetas.
- Gradillas.
- Geles de azarosa.
- Horno microondas.
- Fuente de electroforesis con sus accesorios.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.
- Puntas con filtro.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml y de 0,2 ml (para PCR).
- Contenedores de residuos.
- Bandeja con hielo.
- Ordenador para el análisis bioinformático.

6.1 PROTOCOLOS DE MANTENIMIENTO

Los protocolos de mantenimiento de todos los equipos deben estar descritos en el Sistema de Gestión de Calidad del laboratorio y realizarse de forma rigurosa.

7. PROCEDIMIENTO

Para el estudio del gen ADNr 16S se realizarán los siguientes pasos:

- Extracción del ADN de una muestra biológica.
- Amplificación del gen ADNr 16S con cebadores universales.
- Secuenciación de los fragmentos amplificados.
- Análisis taxonómico de las secuencias obtenidas.

Siempre que se realicen técnicas que incluyan PCR es fundamental tener distribuido el trabajo en áreas:

- Área 1: preparación de reactivos.
- Área 2: manipulación de muestras y extracción de ADN.
- Área 3: amplificación y análisis post-PCR.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 11

7.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras se deben atemperar antes de su procesamiento y se introducirán en tubos rotulados adecuadamente. Se procesarán en cabina de bioseguridad biológica, en el área 2. Se utilizarán las recomendaciones del fabricante para la extracción de ADN de heces con el pre-tratamiento con bolitas de vidrio o soluciones líticas. Se cuantificará la cantidad de ADN de cada muestra y se utilizará la misma cantidad de ADN para cada reacción de amplificación.

7.2 AMPLIFICACIÓN

Para que se produzca la amplificación de forma adecuada es necesario preparar una mastermix con todos los reactivos y añadir el ADN de cada muestra (incluyendo un control positivo y uno negativo). Se debe preparar una hoja de trabajo donde conste la situación de cada muestra y cada control.

A los servicios de secuenciación se les puede enviar directamente el ADN extraído por lo que no es necesaria la información para el proceso de amplificación. A continuación se propone una metodología utilizada para la plataforma Illumina por ser una de las más utilizadas actualmente.

7.2.1 Preparación de reactivos

La preparación de la mastermix de PCR se realizará en el área 1. Es necesario realizar los cálculos de la cantidad de reactivos requeridos según el número de muestras que se vayan a probar y del número de controles. Se mezclarán los diferentes reactivos y se distribuirán 45 µl de la mastermix en cada tubo de la placa de amplificación, que deberá mantener en un baño de hielo.

7.2.2. Amplificación

En el área 2, se añadirán 5 µl del ADN extraído de cada muestra y de los controles a cada tubo de la placa de PCR. Se tapan los tubos y se introducirá la placa en el termociclador, con el programa de amplificación adecuado.

7.2.3. Detección de los productos de amplificación y purificación de amplicones

Se comprobará que el proceso de amplificado ha sido correcto mediante un gel de agarosa (con una concentración adecuada al tamaño del fragmento amplificado, generalmente 0,8%). Posteriormente, se utilizará un kit comercial para purificar los amplicones (siguiendo las instrucciones del fabricante), se cuantificará la cantidad de ADN obtenido y se realizarán las diluciones adecuadas para preparar la cantidad necesaria para las reacciones de secuenciación.

7.3 SECUENCIACIÓN

Actualmente existen servicios de secuenciación, en centros públicos o privados, con alta especialización a nivel tecnológico que suelen ser los encargados de realizar la secuenciación masiva de los productos amplificados o directamente la amplificación y secuenciación desde el ADN extraído y proporcionan a los investigadores las secuencias obtenidas en formatos estándar, una vez completado el proceso.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 11

Lo que debe de elegirse antes de enviar la muestra a secuenciar es el tipo de plataforma que se va a utilizar, de acuerdo con la disponibilidad, el presupuesto, el tipo de muestra y el objetivo del estudio.

7.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y ESTADÍSTICO DE SECUENCIAS DE AMPLICONES DEL GEN RIBOSOMAL 16S. METATAXONOMÍA

Para el análisis bioinformático se necesitan conocimientos específicos. Si bien muchos de los programas pueden correr en sistemas Windows, Mac y Linux, el entorno Linux se está imponiendo como un estándar en bioinformática. Para ello se requiere un ordenador de gama media con una distribución Linux o también se puede proceder a su instalación en una máquina virtual hospedada en cualquier de los otros sistemas.

Todos los programas descritos en este protocolo son de uso libre y se pueden descargar gratuitamente desde la web. El análisis bioinformático consta de:

- Control de calidad de las secuencias.
- Eliminación de secuencias quiméricas.
- Agrupamiento de las secuencias por características de similitud y solapamiento (clustering).
- Asignación taxonómica.

Generalmente los datos proporcionados por los servicios de secuenciación ya han pasado por una fase de control de calidad. En caso contrario, el usuario deberá llevar a cabo por sí mismo las operaciones de filtrado y recorte de las secuencias con el fin de eliminar secuencias cortas o de baja calidad, así como recortar las terminaciones hasta que la calidad media sea lo suficientemente alta para garantizar una buena asignación taxonómica.

En caso de secuencias pareadas procedentes de los sistemas de secuenciación MiSeq/NextSeq500 de Illumina, las secuencias R1 y R2 (left/right o forward/reverse), se tendrán que unir para obtener el amplicón completo. Este paso se realiza después del control de calidad para asegurar un mejor apareamiento de las secuencias manteniendo así altos niveles de calidad en la región intermedia.

Una de las plataformas de análisis más usada es QIIME (<http://qiime.org>). Esta plataforma permite llevar a cabo la mayoría, si no la totalidad, de los análisis necesarios para el estudio de las comunidades microbianas. QIIME, una vez instalado, conlleva consigo todos los programas que sirven para los análisis que se detallan en este protocolo, haciéndolos accesibles y uniformizando las líneas de comando. Para más detalles es importante revisar el manual de cada paso en la propia web del QIIME.

En este protocolo se explican los comandos necesarios para llevar a cabo cada paso del análisis taxonómico. Todos estos pasos están integrados y normalizados en la plataforma QIIME con una sintaxis que une todos los programas, dando al usuario la posibilidad de escoger lo que prefiere y modificar los parámetros, pero en este protocolo se pretende dar una idea de los pasos en su esencia y se pueden aplicar singularmente como fueron concebidos por los autores de cada programa.

El estándar actual de formato para los programas de análisis de secuencias procedentes de métodos de secuenciación masiva es el FASTQ. Las secuencias procedentes de sistemas basados en la tecnología de IonTorrent generalmente se encuentran en formato SFF, similares a los que se realizaban también en la tecnología 454 de Roche. Este formato se traduce de forma bastante sencilla a FASTQ. En algunos casos las secuencias

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 11

todavía llevan restos de adaptadores y cebadores, que se pueden eliminar empleando el programa “cutadapt” (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable>).

7.4.1. Detección de los productos de amplificación y purificación de amplicones

- El estado de calidad de los ficheros se puede visualizar mediante el uso del programa “fastQC” (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).
- Para el control de calidad se puede usar el “prinseq-lite”, uno de los programas empleados para el control de calidad, que permite llevar a cabo, entre muchas funciones, el filtrado de las secuencias de mala calidad o de secuencias muy cortas, el recorte de las terminaciones (trimming), resumen estadístico, etc. (<http://prinseq.sourceforge.net/>). Este programa es un script de perl que se puede instalar en todos sistemas operativos. El programa funciona por línea de comando. Se propone un ejemplo:

```
o prinseq-lite.pl -fastq infile.fastq -out_good infile_cleaned -out_format 3 -min_len 200 -min_qual_mean 20 -out_bad null -trim_qual_right 30 -trim_qual_window 20 -trim_qual_type mean
```

Esta línea ejecuta el script prinseq-lite.pl sobre el fichero de entrada infile.fastq y generando nuevos ficheros cuyo nombre base es infile_cleaned (-out_good infile_cleaned) en formato FASTQ (-out_format 3). La longitud mínima de cada secuencia será de 200 nucleótidos (-min_len 200) y con una calidad mediana de 20, se descartarán las secuencias que no cumplan los parámetros requeridos (-out_bad null). Se aplicará un recorte base por base desde la derecha midiendo que la calidad no baje por debajo del umbral de 30 (-trim_qual_right 30) en una ventana de 20 nucleótidos (-trim_qual_window 20) usando la media (-trim_qual_type mean). Se aconseja consultar el manual en la propia web o mediante el comando:

```
o prinseq-lite.pl -h
```

- En el caso de secuencias emparejadas, como las que se producen por la tecnología MiSeq de Illumina, se puede emplear el programa “fastq-join” de la suite “ea-utils” (<https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils>). A continuación se muestra un ejemplo de línea de comando:

```
o fastq-join readsFile_1.fq readsFile_2.fq -o reads.%.fq
```

Esta línea ejecuta el fastq-join juntando, por las extremidades, las lecturas de los files readsFile_1.fq y readsFile_2.fq, generando como salida de datos un fichero con las secuencias que se han podido unir (reads.join.fq) y dos ficheros para aquellas secuencias cuyos extremos no han podido unirse (reads.un1.fq y reads.un2.fq). El fichero reads.join.fq será el que se va a emplear para los siguientes pasos. En los ficheros reads.un1.fq y reads.un2.fq quedarán unas cuantas secuencias pero, si el proceso de secuenciación ha ido bien, su número tendría que ser reducido.

- En algunos casos puede ser necesario transformar ficheros en formato “fastq” a formato “fasta”. Para ello se puede emplear el comando fastq_to_fasta de la suite FASTX Toolkit que contiene muchas herramientas de uso para manejar datos de secuencias (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Por ejemplo, para pasar de formato “fastq” a “fasta” se puede usar esta línea de comando:

```
o fastq_to_fasta -i reads.join.fq -o reads.joined.fasta
```

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 8 de 11

7.4.2. Eliminación de secuencias quiméricas

• El siguiente paso consta de la eliminación de secuencias quiméricas que se pueden haber generado durante el proceso de amplificación. Estas secuencias se pueden detectar cuando los dos extremos difieren mucho en sus asignaciones taxonómicas. Uno de los programas que se puede emplear en este proceso es el “usearch”, que es un programa para búsqueda y agrupamiento (clustering) de datos de secuenciación masiva (<http://drive5.com/usearch>). A continuación se muestra una línea de ejemplo que explica el paso de eliminación de las secuencias quiméricas.

- `usearch -uchime_ref reads.join.fasta -db 16s_ref.udb -uchimeout reads_noChimera.fasta -strand plus`

Con esta línea, el usearch buscará secuencias quiméricas sobre el dataset reads.join.fasta (reads.join.fasta) usando la base de datos ya formateado para usearch 16s_ref.udb (ver después) y escribiendo un fichero de salida. El comando termina con el parámetro -strand plus que, según el manual, está todavía en fase experimental pero sirve para definir la orientación de las secuencias. En este caso la definición probablemente más importante es la de la base de datos de referencia. En la web de usearch, los autores sugieren el uso de la base de las bases de datos de referencia de otro programa: la CS_Gold del Chimera Slayer desde el Microbiome Utilities Portal del Broad Institute (<http://microbiomeutil.sourceforge.net/>) o el RDP_Gold procedente del Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu>). Ambas bases de datos están listas para ser descargadas desde la misma web de usearch:

- CS_Gold: <http://drive5.com/uchime/gold.fa>
- RDP_Gold: http://drive5.com/uchime/rdp_gold.fa

7.4.3. Agrupamiento de las secuencias por características de similitud y solapamiento (*clustering*)

Si bien existen varios programas para la definición de *clusters* de secuencias basados en OTU (Operative Taxonomic Units), entre ellos se explica a continuación el funcionamiento de “usearch” y “CROP”. El primero usa el algoritmo uparse, integrado en el programa usearch bajo el comando -cluster_otu, muy usado por su rapidez de ejecución de grandes volúmenes de datos .

- `usearch -usearch_global reads_noChimera.fasta -db otus.fasta -strand plus -id 0.97 -otutabout otu_table.txt`

En este caso se buscarán *clusters* en el fichero “reads_noChimera.fasta” generando un nuevo fichero llamado “otus.fasta”, generando clusters entre aquellas secuencias que comparten como mínimo un 97% de identidad. También se obtiene como salida una tabla con los nombres de las OTUs y todas las secuencias contenida en cada cluster.

Otro programa de *clustering* es el CROP, que emplea un método gaussiano donde no se necesita especificar un valor de similitud; CROP usa un sistema probabilístico Bayesiano con un valor flexible de agrupamiento por similitud que reduce el efecto de los errores de PCR y secuenciación (<https://github.com/tingchenlab/CROP>). Usando el programa CROP, la línea mínima de comando sería:

- `CROPLinux -i reads_noChimera.fasta -o otus.fasta -s`

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 9 de 11

que, de acuerdo con el manual, aplica varios parámetros por defecto, buscando clusters alrededor de una distribución de Gauss de distancias entre alineamientos con un centro al 97%. También el CROP generará una tabla de clusters y la lista de todas las OTUs con las secuencias que le pertenecen.

7.4.4. Asignación taxonómica

Para la asignación taxonómica se pueden usar varios programas basados en distintos abordajes. Entre los programas más usados encontramos el rdp_classifier, un algoritmo de usearch, el blast y el SINA.

- usearch mediante el comando -utax. Para asignar secuencias mediante usearch -utax, se necesita una base de datos apropiadamente formateada que se obtiene mediante el comando:

- usearch -makeudb_utax refdb.fa -output refdb.udb -taxconfsin 500.tc

donde refdb.fa es nuestra base de datos. Esto permite usar diferentes bases de datos de la que vienen por defecto, por ejemplo, con el rdp_classifier. Cuando se quiere una asignación taxonómica que llegue hasta nivel de especie, se aconseja el uso de la clasificación de la base de datos de greengenes desde la web: <http://greengenes.secondgenome.com/downloads> donde se pueden encontrar las últimas versiones de las bases de secuencias de 16S ribosomales de greengenes.

A continuación se puede seguir con la asignación taxonómica mediante el comando:

- usearch -utax otus.fasta -db tax.udb -utaxout utax.txt -strand both

que clasifica las secuencias del fichero otus.fasta usando el database recién generado tax.udb y produciendo la tabla de anotación utax.txt intentando clasificar las secuencias en ambas direcciones (-strand both).

- El otro programa para la asignación taxonómica que se puede utilizar es el rdp_classifier que procede del Riboso-mal Database Project ya citado anteriormente (<https://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>). y es un clasificador de tipo bayesiano (<https://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>). En el momento de descargarlo él mismo contiene todas las bases de datos ya preinstaladas en sus últimas revisiones. El rdp_classifier, mediante sus bases de datos, permite clasificar hasta nivel de género secuencias de 16S rRNA de bacteria y arquea así como espaciadores intergénicos ribosomales (ITS) y secuencias ribosomales largas (LSU) de hongos.

- rdp_classifier classify -q otus.fasta -o taxonomy.rdp -c 0.8 -f fixrank

En esta línea se define el fichero de entrada (-q otus.fasta), el fichero de salida (-o taxonomy.rdp), el umbral de asignación mínimo requerido (0.8, se sugiere mirar el manual para una explicación más detallada), y el tipo de rangos taxonómicos que se quieren reportar en la tabla de resultados que, en este caso se limitarán a reino, dominio, filo, clase, orden, familia y género (-f fixrank). Si fuera necesario se puede entrenar el clasificador para usar otras bases de datos. La plataforma QIIME contiene un método simplificado para obtener una clasificación mediante el programa rdp_classifier usando otras bases de datos (por ejemplo las de greengenes).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 10 de 11

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Mediante el análisis bioinformático descrito en el punto 7.4 se obtiene el análisis taxonómico de las secuencias obtenidas, que se expresan en forma de abundancia relativa de los diferentes filo, clase, orden, familia, género y en el caso que sea posible de especie, en cada muestra estudiada y se pueden comparar en diferentes muestras o en muestras agrupadas de acuerdo con una determinada característica del paciente. Los resultados habituales llegan al nivel de género y muy rara vez se puede conocer la especie por la longitud de las secuencias.

Para comparar los resultados entre muestras o entre diferentes grupos que compartan una determinada característica se utilizan también los criterios de alfa diversidad (la riqueza de especies de una comunidad que se considera homogénea) y de beta diversidad (la diversidad entre varias muestras que se puede medir de forma cuantitativa, *weighted*, mide abundancia de microorganismos observados, o de forma cualitativa, *unweighted*, que tiene en cuenta la presencia o ausencia de los microorganismos).

9. RESPONSABILIDADES

La recogida de las muestras, su transporte y conservación hasta la recepción en el lugar de procesamiento es responsabilidad del paciente, asesorado por los facultativos del laboratorio de Microbiología. El procesamiento de las muestras es responsabilidad del personal técnico, junto con el rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas.

La realización de las técnicas es responsabilidad del personal técnico. La supervisión de las técnicas, la actualización de los procedimientos, la información de resultados y su interpretación es responsabilidad del facultativo.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El personal debe conocer y aplicar las normas generales de bioseguridad del laboratorio. Para evitar posibles contaminaciones con productos amplificados durante el procedimiento se debe ser muy estricto en la realización de técnicas de PCR y en el mantenimiento del flujo de trabajo, de forma que vaya del área 1 a la 2, y de ésta a la 3.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El estudio de la microbiota intestinal mediante estudio taxonómico del gen ADNr 16S solo permite detectar e identificar las bacterias presentes en las muestras, por lo que no refleja la microbiota completa sino únicamente la parte bacteriana.

Un almacenamiento inadecuado de la muestra puede dar lugar a pérdida de microorganismos y por tanto a resultados no adecuados.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Determinación metataxonómica de la composición de la microbiota intestinal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 11 de 11

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
2. Aronesty E. ea-utils: "Command-line tools for processing biological sequencing data". 2011. Available online at <https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils>
3. Budding AE, Grasman ME, Eck A, Bogaards JA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, van Bodegraven AA, Savelkoul PH. Rectal swabs for analysis of the intestinal microbiota. *PLoS One* 2014; 9(7): e101344.
4. Caporaso, JG, Kuczynski, J, Stombaugh, J, Bittinger, K, Bushman, FD, Costello, EK, Fierer, N, Peña, AG, Goodrich, JK, Gordon, JI, Huttley, GA, Kelley, ST, Knights, D, Koenig, JE, Ley, RE, Lozupone, CA, McDonald, D, Muegge, BD, Pirrung, M, Reeder, J, Sevinsky, JR, Turnbaugh, PJ, Walters, WA, Widmann, J, Yatsunencko, T, Zaneveld, J, Knight, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; 5:33-6. Available online at <http://qiime.org/>.
5. Cole, JR, Wang, Q, Fish, JA, Chai, B, McGarrell, DM, Sun, Y, Brown, CT, Porras-Alfaro, A, Kuske, CR, Tiedje, JM. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42 Database issue:D633-42.
6. Conlan, S, Kong, HH, Segre, JA. Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project. *PLoS One* 2012; 10:e47075.
7. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011; 16:2194-200. Available online at <http://www.drive5.com/usearch/>.
8. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 2013; 10:996-8.
9. Gordon A. FASTX-Toolkit: FASTQ/A short-reads pre-processing tools. 2008. Available online at http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/
10. Gorzelak MA, Gill SK, Tasnim N, Ahmadi- Vand Z, Jay M, Gibson DL. Methods for improving human gut microbiome data by reducing variability through sample processing and storage of stool. *PLoS One* 2015; 10: e0134802.
11. Hao X, Jiang, R, Chen, T. Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics* 2011; 5:611-8.
12. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 2011; 1. Available online at <https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>.
13. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011; 6:863-4. Available online at <http://prinseq.sourceforge.net/>.
14. Song SJ, Amir A, Metcalf JL, Amato KR, Xu ZZ, Humphrey G, Knight R. Preservation methods differ in fecal microbiome stability, affecting suitability for field studies. *mSystems* 2016; 1:e00021-16.
15. Tedjo DI, Jonkers DM, Savelkoul PH, Masclee AA, van Best N, Pierik MJ, Penders J. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects. *PLoS One* 2015; 10: e0126685.
16. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73:5261-7.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Transferencia de materia fecal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 5

PNT-MB-03

Transferencia de materia fecal

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Transferencia de materia fecal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir la preparación de una muestra de heces para llevar a cabo una transferencia de materia fecal. La preparación se realiza en el laboratorio de Microbiología de forma coordinada con el Servicio de Gastroenterología, que será el responsable final de realizar la transferencia.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología en los que se vaya a realizar la preparación de materia fecal para su transferencia.

2. FUNDAMENTO

La transferencia de materia fecal es una técnica que se utiliza principalmente para el tratamiento de las recidivas de la diarrea causada por *Clostridium difficile*, sin embargo esta técnica puede aplicarse en otras patologías. Se basa en la restauración integral de la microbiota intestinal de un paciente, mediante la introducción de la microbiota completa de una persona gastrointestinalmente sana.

La microbiota intestinal de los pacientes que sufren la diarrea causada por *C. difficile* es aberrante con una sobre-representación de este patógeno en ausencia del resto de especies bacterianas. Esta patología suele responder muy bien a los antibióticos de primera línea, metronidazol y vancomicina, pero un 20% de los pacientes puede sufrir episodios recidivantes. La fidaxomicina suele ser útil en las recaídas, pero también fracasa en algunos pacientes, y es en estos casos cuando se ha demostrado la utilidad de la transferencia de heces. Recientemente se ha sugerido adelantar la transferencia de heces a la segunda recidiva de la diarrea, en lugar de la tercera recaída que es lo que se hace actualmente. La tasa de curación con este método suele alcanzar el 90%, y los efectos adversos son mínimos.

Aunque por el momento no existe suficiente evidencia científica, los pacientes con colitis ulcerosa también podrían beneficiarse de esta técnica. En este caso las tasas de remisión clínica completa son bajas (<30%) si bien parece depender mucho del donante.

Otra de las posibles aplicaciones de la transferencia de materia fecal es la descontaminación intestinal de bacterias multirresistentes a los antibióticos.

Uno de los puntos clave de todo proceso de transferencia de materia fecal es la elección del donante. En el caso de diarrea por *C. difficile*, el donante ideal es un familiar directo que conviva con el paciente, ya que se trata de restaurar los mismos clones que el paciente tenía anteriormente. Sin embargo, en el caso de colitis ulcerosa el donante no debe tener ninguna relación de parentesco ni de convivencia con el paciente, ya que en este caso se trata de reemplazar los clones que activan al sistema inmune por otros que no provoquen esta respuesta. En cualquier caso a los donantes se les debe de realizar un estudio completo al igual que para otro tipo de trasplante que permita descartar todo tipo de enfermedades transmisibles.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Transferencia de materia fecal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

2. Pérez Saéñz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Saéñz JL, Rojo E . Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

3. Pérez Saéñz JL (Coordinador). Ayats Ardite J, Fortún Abete J, de Oña Navarro M, Pérez Saéñz JL, Pumarola Suñé T. Microbiología del trasplante. Procedimientos en Microbiología Clínica 5a. SEIMC 2010. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

4. Vila Estape J (Coordinador). Álvarez Martínez M, Buesa Gómez J, Castillo García J, Vila Estape J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Procedimientos en Microbiología Clínica 30. SEIMC 2008. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra a utilizar son las heces, que se pueden recoger bien en el mismo hospital o bien en casa y enviarse posteriormente al laboratorio, utilizando contenedores estériles de coprocultivo. Se necesitan entre 50 y 100 g de heces (una o dos deposiciones completas), aunque siempre es recomendable partir de cantidades mayores para poder guardar una alícuota por si se necesita re-transferir al paciente. En el caso de colitis ulcerosa, se procesará también una muestra de heces adicional que se administrará como dosis de recuerdo semanal. Estas dosis se prepararán en el laboratorio de Microbiología, alícuotadas en volúmenes de 50 ml e inmediatamente congeladas. El paciente se administrará mediante enema una dosis de recuerdo a la semana hasta completar un total de 5 dosis.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Una vez introducida la muestra en el contenedor estéril de coprocultivo, se rellenará el espacio sobrante con agua mineral para minimizar la oxidación por exposición al aire y la muerte de las bacterias anaerobias. Las muestras se transportarán lo antes posible al laboratorio manteniéndolas a 4°C. Este procedimiento no suele ser rutinario, por lo que se suele entregar la muestra en mano, y no a través del sistema de recepción y registro habitual de muestras.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

El problema más importante de las muestras para transferencia de heces es que la cantidad sea insuficiente. Es por ello que al donante se le solicitarán al menos dos deposiciones completas para alcanzar los 100 gramos.

4.4. DETECCIÓN DE POSIBLES ENFERMEDADES TRANSMISIBLES

Al donante se le realizará un estudio serológico siguiendo el procedimiento de la SEIMC de "Microbiología del trasplante", para detectar las principales infecciones trasmisibles que podrían ser transmitidas al paciente. Además, se estudiará una muestra de heces, siguiendo el procedimiento de la SEIMC de "Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales" para descartar la presencia de posibles microorganismos productores de diarrea. Es fundamental también descartar la presencia de parásitos en las heces y de *C. difficile* toxigénico.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Transferencia de materia fecal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 5

5. APARATOS Y MATERIAL

- Contenedores estériles de coprocultivo.
- Agua destilada estéril.
- Agitador tipo vórtex o batidora de aspas.
- Balanza.
- Centrífuga tipo Beckman para recipientes de 250 ml. (rotor JA-14).
- Recipientes de 250 ml.
- Colador.
- Colonoscopio.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra de heces es la que se utiliza con mayor frecuencia para el estudio de la microbiota intestinal. El procedimiento para obtención de estas muestras se debe realizar siguiendo la metodología habitual (Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003).

6.2. TRASPLANTE DE MATERIA FECAL

Las muestras se recogerán en contenedores estériles de acuerdo con Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003 y se entregarán en el laboratorio. Si la muestra no se va a procesar de forma inmediata se añadirá conservante o estabilizador de ADN o ARN según el estudio a realizar y se congelarán a -80°C de acuerdo con las instrucciones del fabricante del reactivo estabilizante.

Si la muestra no se puede enviar al laboratorio de forma inmediata, el paciente puede recoger la muestra y congelarla en los 15 minutos siguientes a la defecación (se puede conservar hasta 3 días en el congelador del domicilio). La muestra se entregará en el laboratorio teniendo en cuenta que puede sufrir hasta 4 ciclos de congelación-descongelación sin que el microbioma sufra cambios importantes.

7. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La mejoría clínica del trasplante suele ser inmediata, y al paciente se le da el alta a los dos días después del trasplante. Para evaluar la implantación de la microbiota del donante es recomendable recoger muestra de heces de los pacientes antes del alta y al mes. En algunos casos tras la transferencia se puede aislar la misma cepa de *C. difficile* que causó la diarrea, pero sin sintomatología clínica.

8. RESPONSABILIDADES

La selección del donante corre a cargo del gastroenterólogo, y éste deberá responsabilizarse de la recogida y transporte de la muestra. El facultativo será responsable de la preparación de la muestra, mientras que el seguimiento clínico del paciente correrá a cargo del Servicio de Gastroenterología.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Transferencia de materia fecal	PNT-MB-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

9. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene, así como las normas de trabajo en los laboratorios de Microbiología. Todas las manipulaciones de la muestra deben realizarse con guantes y a ser posible en campana de bioseguridad.

Todo el instrumental no desechable utilizado para preparar la muestra de heces deberá ser esterilizado para futuros usos.

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El éxito del trasplante de heces depende de la cantidad de la muestra. En el caso de que la muestra sea insuficiente es recomendable suspender el proceso y repetirlo cuando se disponga de mayor cantidad de muestra.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Borody T, Fischer M, Mitchell S, Campbell J. Fecal microbiota transplantation in gastrointestinal disease: 2015 update and the road ahead. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 9:1379-91.
2. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20 (Suppl 2):1-26.
3. Moayyedi P, Marshall JK, Yuan Y, Hunt R. Canadian Association of Gastroenterology position statement: fecal microbiota transplant therapy. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2014; 28:66-8.
4. Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, Libertucci J, Wolfe M, Onischi C, Armstrong D, Marshall JK, Kassam Z, Reinisch W, Lee CH. Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2015; 149:102-109.e6.
5. García-Fernández S, Morosini MI, Cobo M, Foruny JR, López-Sanromán A, Cobo J, Romero J, Cantón R, Del Campo R. Gut eradication of VIM-1 producing ST9 *Klebsiella oxytoca* after fecal microbiota transplantation for diarrhea caused by a *Clostridium difficile* hypervirulent R027 strain. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 86:470-1.
6. Sha S, Liang J, Chen M, Xu B, Liang C, Wei N, Wu K. Systematic review: faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014; 39:1003-32.
7. Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ, Khoruts A. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107:761-7.