



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Microbiota nasofaríngea en niños con enfermedad neumocócica invasiva, infección respiratoria banal y niños sanos: caracterización, factores moduladores y valor diagnóstico diferencial**

Desirée Henares Bonilla



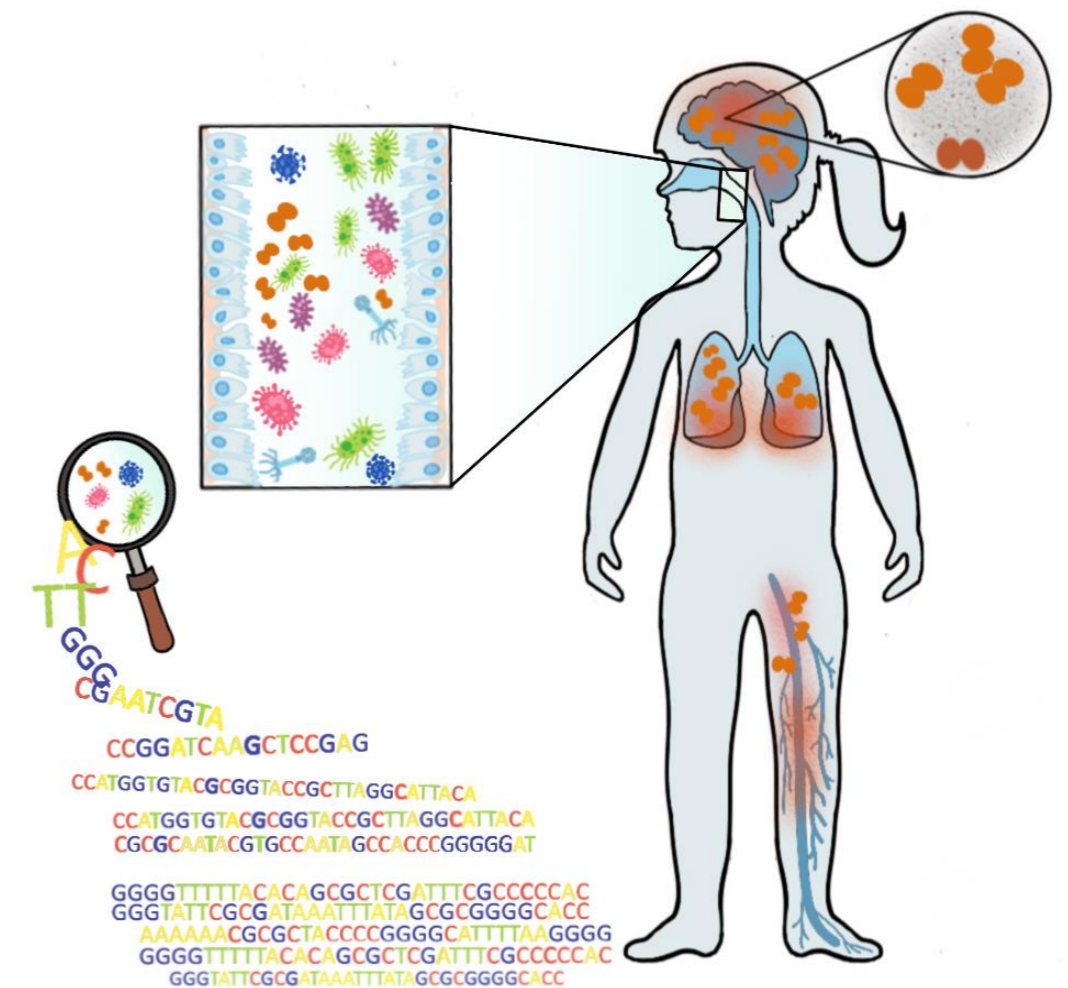
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

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

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

# Microbiota nasofaríngea en niños con enfermedad neumocócica invasiva, infección respiratoria banal y niños sanos: caracterización, factores moduladores y valor diagnóstico diferencial

Memoria presentada por **Desirée Henares Bonilla**  
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona



Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional  
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud  
Universidad de Barcelona

**Tutora de tesis:**

Dra. Iolanda Jordan Garcia

**Directores de tesis:**

Dra. Carmen Muñoz-Almagro  
Dr. Raúl Cabrera-Rubio  
Dr. Cristian Launes Montaña







UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional  
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud  
Universidad de Barcelona

**Microbiota nasofaríngea en niños con enfermedad  
neumocócica invasiva, infección respiratoria banal y  
niños sanos: caracterización, factores moduladores y  
valor diagnóstico diferencial**

---

TESIS DOCTORAL  
2022

*La doctoranda,*

**Desirée Henares Bonilla**

Visto bueno de los directores de tesis,

Dra. Carmen  
Muñoz-Almagro

Dr. Raúl  
Cabrera-Rubio

Dr. Cristian Launes  
Montaña



**Microbiota nasofaríngea en niños con enfermedad neumocócica invasiva,  
infección respiratoria banal y niños sanos: caracterización, factores  
moduladores y valor diagnóstico diferencial**

**DOCTORANDA**

Desirée Henares Bonilla

**Directora de tesis**

---

*Carmen Muñoz-Almagro, MD, PhD*

Grupo Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma del Institut de Recerca Sant Joan de Déu  
Catedrática del Departamento de Medicina de la Universidad Internacional de Cataluña  
CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)

**Director de tesis**

---

*Raúl Cabrera-Rubio, PhD*

Teagasc Food Research Centre (TEAGASC, Irlanda)  
APC Microbiome Ireland

**Director de tesis**

---

*Cristian Launes Montaña, MD, PhD*

Servicio de Pediatría del Hospital Sant Joan de Déu  
Grupo Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma del Institut de Recerca Sant Joan de Déu  
CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)

**Tutora de tesis**

---

*Iolanda Jordan Garcia, MD, PhD*

Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Sant Joan de Déu  
Dirección Médica del Hospital Sant Joan de Déu  
Grupo Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma del Institut de Recerca Sant Joan de Déu  
CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)

El trabajo de este proyecto de tesis presentado por la doctoranda se ha realizado bajo la dirección de la **Dra. Carmen Muñoz-Almagro**, el **Dr. Raúl Cabrera-Rubio** y el **Dr. Cristian Launes Montaña**, y la tutorización de la **Dra. Iolanda Jordan Garcia**, en el grupo de Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma del Institut de Recerca Sant Joan de Déu y en el grupo 57 del CIBER de Epidemiología y Salud Pública.





# Agradecimientos

A mis padres, por todo lo que me han dado y enseñado. Ellos son mi ejemplo de trabajo, esfuerzo, valentía y superación que me ha hecho seguir adelante. Gracias, por todo.

A mi tutora y directores de tesis: la Dra. Iolanda Jordan Garcia, la Dra. Carmen Muñoz-Almagro, el Dr. Raúl Cabrera-Rubio y el Dr. Cristian Launes Montaña, por todo lo que he aprendido de ellos y por su disponibilidad en todo momento. En especial a la Dra. Carmen Muñoz-Almagro, por su generosidad y confianza en mí, incluso cuando ni yo misma me lo he creído, y por darme siempre la oportunidad de seguir creciendo y de llegar hoy aquí. También al Dr. Raúl Cabrera-Rubio, por ser mi guía en un momento en el que estaba muy perdida empezando en el mundo de la bioinformática y por ser, también, un buen amigo.

A los servicios de Urgencias y de Pediatría del Hospital Sant Joan de Déu, y muy especialmente a la Dra. Susanna Hernández, la Dra. Mariona Fernández, la Dra. Anna Fernández-Lopez y el Dr. Daniel Penela, por su valiosa ayuda en la inclusión de pacientes en los diferentes estudios.

Al Dr. Alex Mira, reconocido experto en el campo del microbioma oral, por su amabilidad y por enriquecer con sus conocimientos y sugerencias el contenido de esta tesis.

A mis compañeros del grupo de investigación en Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma del Institut de Recerca Sant Joan de Déu con los que trabajo codo con codo; a Pedro, por su compañerismo, trabajo e inestimable contribución al desarrollo de este proyecto desde múltiples aspectos; a Amaresh, porque, aunque las dos tenemos nuestro carácter, siempre nos hemos ayudado y esta tesis, en parte, también es suya; a Alba, por sus emails graciosos que siempre sacan una sonrisa y por estar siempre dispuesta a ayudar; a Lucía, la chiquitina del grupo, por sus buenas energías; y a Muntsa, porque, aunque llevamos menos tiempo trabajando juntas, es reconfortante saber que siempre existe un apoyo cerca como el suyo.

A todos los integrantes del servicio de laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu y al Dr. Bonaventura Ruiz. En especial, a mis compañeros más cercanos durante todos estos

años: a Héctor, Irene, Selene, Natalia, Anny, Miguel, Marta, Laia, Ana, María, Carles, Cristina, Elena, Estefanía, Isa, Assumpta, Meri, Raul y a todos aquellos con los que me he cruzado en algún momento de esta etapa y me han ayudado profesional y/o personalmente a llevar a cabo este trabajo.

A Jessica, mi compañera y pilar fundamental en la vida. Sin duda, la persona que más ha sufrido conmigo los quebraderos de cabeza de esta tesis, pero también la que más ha celebrado mis triunfos. Gracias por apoyarme siempre.

A José, por su preciada ayuda, sin la cual hubiera sido mucho más complicado el camino.

A mis hermanos, mi familia y mis amigos, porque son lo mejor que tengo y el motor que me impulsa cada día.

## Financiación

Los trabajos presentados en esta tesis doctoral se enmarcan, principalmente, dentro del proyecto "*Microbiota de riesgo o resiliente a la infección respiratoria aguda en niños y su utilidad en el diagnóstico diferencial entre neumonía/bronconeumonía bacteriana e infección viral respiratoria*" financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (PI16/00174). Asociado a este proyecto, la doctoranda fue beneficiaria de un Contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) de esta misma institución (FI17/00248) para el desarrollo de la presente tesis doctoral. La doctoranda también recibió una beca de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) para una estancia de investigación en *Teagasc Food Research Centre*, un centro perteneciente al instituto de investigación *APC Microbiome* en Irlanda.



# Índice general

<b>Acrónimos</b>	<b>VII</b>
<b>Enumeración de artículos que componen la tesis doctoral</b>	<b>IX</b>
<b>Resumen</b>	<b>XI</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Enfermedad Neumocócica Invasiva (ENI) . . . . .	3
1.1.1 Morbilidad y mortalidad de la ENI . . . . .	3
1.1.2 Prevención de la ENI . . . . .	3
1.1.3 Diagnóstico de la ENI . . . . .	4
1.1.4 Tratamiento antibiótico de la ENI . . . . .	5
1.1.5 Factores de riesgo asociados a la ENI . . . . .	6
1.2 Microbiota del tracto respiratorio superior . . . . .	11
1.2.1 Desarrollo de la microbiota del tracto respiratorio superior; factores que modulan su estabilidad y equilibrio en edades tempranas de la vida . . . . .	12
1.2.2 Microbiota del tracto respiratorio superior e infección respiratoria aguda . . . . .	20
1.2.3 Microbiota del tracto respiratorio superior y ENI . . . . .	22
1.2.4 Microbiota del tracto respiratorio superior como marcador diagnóstico . . . . .	23
1.3 Metodologías para el estudio del microbioma humano . . . . .	24
1.3.1 Técnicas basadas en cultivo . . . . .	25
1.3.2 Técnicas moleculares . . . . .	25
1.3.3 Aproximaciones ómicas para el estudio del microbioma humano . . . . .	27
1.3.4 Importancia del gen ribosomal ARNr 16S para la caracterización de la microbiota humana . . . . .	29
1.3.5 Tecnologías para la secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S . . . . .	30
1.3.6 Análisis bioinformático de los datos de secuenciación del gen ARNr 16S . . . . .	33
1.3.7 Contaminación en muestras de baja biomasa . . . . .	36
1.3.8 Análisis de diversidad y abundancia diferencial . . . . .	37
<b>2 Justificación e Hipótesis</b>	<b>39</b>
2.1 Justificación . . . . .	41

2.2 Hipótesis . . . . .	43
<b>3 Objetivos</b>	<b>45</b>
<b>4 Resultados</b>	<b>49</b>
Primer artículo: <i>"Nasopharyngeal microbiota in children with invasive pneumococcal disease: identification of bacteria with potential disease-promoting and protective effects"</i> . . . . .	53
Segundo artículo: <i>"Differential nasopharyngeal microbiota composition in children according to respiratory health status"</i> . . . . .	73
Tercer artículo: <i>"Rapid increase of oral bacteria in nasopharyngeal microbiota after antibiotic treatment in children with invasive pneumococcal disease"</i> . . . . .	99
<b>5 Discusión</b>	<b>117</b>
<b>6 Conclusiones</b>	<b>143</b>
<b>7 Referencias</b>	<b>147</b>
<b>8 Anexo</b>	<b>177</b>

## Acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosomal
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
AUC	Área Bajo la Curva
dNTP	Desoxirribonucleótido Trifosfato
ENI	Enfermedad Neumocócica Invasiva
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
Gb	Gigabase
GC	Guanina-Citosina
HSJD	Hospital Sant Joan de Déu
IC	Intervalo de Confianza
ITS	Espaciador Intergénico
LAMP	Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle
MBL	Lectina de Unión a Manosa
NGS	Secuenciación de Nueva Generación
OMA	Otitis Media Aguda
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONT	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>
OTU	Unidad Taxonómica Operativa
pb	Pares de bases
PBP	Proteína de Unión a la Penicilina
pCO <sub>2</sub>	Presión Parcial de Dióxido de Carbono

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pO <sub>2</sub>	Presión Parcial de Oxígeno
RH	Humedad Relativa
RI	Rango Intercuartil
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
<i>rrn</i>	Operón de ARN ribosomal
SMRT	<i>Single Molecule, Real-Time</i>
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VNC	Vacuna Neumocócica Conjugada
VRS	Virus Respiratorio Sincitial



## Tesis en formato de compendio de artículos

La tesis consta de tres artículos y tres objetivos principales:

**Artículo 1:** Camelo-Castillo A, **Henares D**, Brotons P, Galiana A, Rodriguez JC, Mira A, Muñoz-Almagro C. Nasopharyngeal microbiota in children with invasive pneumococcal disease: identification of bacteria with potential disease-promoting and protective effects. *Front Microbiol.* 2019 Jan;10:11. doi: 10.3389/fmicb.2019.00011

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Microbiología. Clasificación; 28/136. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 5.640*

El artículo 1 responde parcialmente a los objetivos 1 y 2 de la presente tesis doctoral.

**Artículo 2:** **Henares D**, Brotons P, de Sevilla MF, Fernandez-Lopez A, Hernandez-Bou S, Perez-Argüello A, Mira A, Muñoz-Almagro C, Cabrera-Rubio R. Differential nasopharyngeal microbiota composition in children according to respiratory health status. *Microb Genom.* 2021 Oct;7(10):000661. doi: 10.1099/mgen.0.000661

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Genética y Herencia. Clasificación; 37/176. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 5.237*

El artículo 2 responde a los objetivos 1 y 2 de la presente tesis doctoral utilizando un enfoque y un diseño de estudio diferente al del primer artículo.

**Artículo 3:** **Henares D**, Rocafort M, Brotons P, de Sevilla MF, Mira A, Launes C, Cabrera-Rubio R, Muñoz-Almagro C. Rapid Increase of Oral Bacteria in Nasopharyngeal Microbiota After Antibiotic Treatment in Children With Invasive Pneumococcal Disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Oct;11:744727. doi: 10.3389/fcimb.2021.744727

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Microbiología. Clasificación; 33/136. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 5.293*

El artículo 3 responde al objetivo 3 de la presente tesis doctoral.



## Resumen

**INTRODUCCIÓN:** *Streptococcus pneumoniae* es una bacteria que coloniza de forma asintomática la nasofaringe de niños sanos. Sin embargo, en un número reducido de casos es capaz de invadir territorio normalmente estéril y causar enfermedad neumocócica invasiva (ENI). Se han descrito algunos factores relacionados con el patógeno, el huésped o el ambiente implicados en esta susceptibilidad diferencial a la ENI. En los últimos años, además, se ha observado que la microbiota nasofaríngea juega un papel importante en múltiples enfermedades humanas y que tiene un elevado potencial como herramienta de prevención y diagnóstica. No obstante, se sabe poco sobre la relación de la microbiota nasofaríngea con la ENI y con factores implicados en la prevención y el tratamiento de esta enfermedad.

**HIPÓTESIS:** La microbiota nasofaríngea podría estar relacionada con el estado de salud respiratoria en población pediátrica. Específicamente, podría existir una composición de microbiota nasofaríngea diferencial asociada a la transición de *S. pneumoniae* como estado de portador a causar ENI. Estas diferencias podrían ser de utilidad para el diagnóstico de la enfermedad en muestra nasofaríngea. Factores relacionados con la prevención y el tratamiento de la ENI, como la lactancia materna, la vacunación neumocócica o los antibióticos, también podrían ser moduladores importantes de la composición de microbiota nasofaríngea en la infancia.

**OBJETIVOS:** Caracterizar y comparar la microbiota nasofaríngea de niños con ENI, niños con infección respiratoria viral banal y niños sanos, y valorar la utilidad de ésta para el diagnóstico de ENI. Describir la composición de microbiota nasofaríngea en función de la duración de la lactancia materna, el estado de vacunación neumocócica y el grado de exposición a antibióticos utilizados para el tratamiento de la ENI en niños hospitalizados.

**MÉTODOS:** Se realizaron tres estudios observacionales (dos estudios caso-control y un estudio transversal) en los que se reclutaron niños menores de dieciocho años con distintos estados de salud respiratoria. En el primer estudio caso-control se incluyeron niños con ENI confirmada microbiológicamente y niños sanos reclutados en cinco hospitales de Cataluña entre 2014-2015. En el segundo estudio caso-control, realizado exclusivamente en

Hospital Sant Joan de Déu (HSJD) en el período 2014-2018, se incluyeron niños con ENI no expuestos a antibióticos ( $\leq 24$  horas) y se parearon con dos grupos de controles: niños sanos y niños con infección viral banal en el tracto respiratorio superior. En el tercer estudio se incluyeron todos los casos de ENI confirmados y atendidos en HSJD entre 2014-2018, independientemente de su exposición antibiótica. Se recogió una muestra de nasofaringe de cada sujeto y se realizó la secuenciación del gen de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16S, o gen ARNr 16S, y estudios moleculares específicos (detección y cuantificación del gen *lytA* de neumococo, tipado capsular de *S. pneumoniae* y array molecular de dieciséis virus respiratorios). Se recogieron datos epidemiológicos y clínicos, incluyendo la duración de la lactancia materna, el estado de vacunación y la exposición a antibióticos antes de la recogida de la muestra.

**PRINCIPALES RESULTADOS:** En la presente tesis se ha identificado una composición de microbiota nasofaríngea significativamente distinta en función del estado de salud respiratoria del individuo. En los niños sanos se identificó una microbiota nasofaríngea rica y diversa, con mayor abundancia de especies comensales como *Dolosigranulum pigrum*, *Moraxella lincolnii* y *Corynebacterium* spp. En el otro extremo se identificó una microbiota asociada a la ENI con muy poca riqueza y diversidad. La microbiota nasofaríngea asociada a esta enfermedad también se caracterizó por una mayor abundancia del género *Streptococcus*, mayores tasas de portadores y carga de *S. pneumoniae* en nasofaringe (frecuentemente serotipos invasivos y cubiertos por la vacuna neumocócica conjugada 13-valente), una menor abundancia de bacterias comensales y una mayor proporción de infección viral en comparación con niños sanos. El perfil de microbiota nasofaríngea asociado a los niños con infección viral banal se caracterizó por niveles intermedios de riqueza y diversidad entre ambos grupos de sujetos, los casos de ENI y los niños sanos, así como también abundancia intermedia de *D. pigrum* y otras bacterias. Estas diferencias detectadas en la microbiota nasofaríngea de acuerdo al estado de salud respiratoria permitieron clasificar con elevada precisión los casos de ENI y diferenciarlos de los controles. Por otro lado, tanto una duración de la lactancia materna  $\geq 6$  meses como la vacunación y el tratamiento antibiótico para la ENI tuvieron un efecto significativo en la composición de microbiota nasofaríngea en niños. Estos dos últimos factores se relacionaron con una mayor abundancia en nasofaringe de bacterias típicas de la cavidad oral. El uso de antibiótico más de 72 horas se asoció con una mayor abundancia de estreptococos del grupo viridans y de *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*.

**CONCLUSIONES:** En los pacientes con ENI se produce una disbiosis de la microbiota nasofaríngea caracterizada por el aumento de *S. pneumoniae* y la reducción de bacterias comensales. Estas perturbaciones tienen valor diagnóstico para diferenciar los casos de ENI de controles sanos y niños con infección respiratoria viral. La microbiota nasofaríngea

en población pediátrica está, además, fuertemente influenciada por la lactancia materna, la vacunación neumocócica y la toma de antibióticos. Los resultados sugieren que la vacunación, y especialmente la toma de antibióticos, dejan un vacío en el nicho ecológico de la nasofaringe que es reemplazado de forma rápida por bacterias típicas de la cavidad oral, y en el caso de los antibióticos, también por bacterias estreptocócicas del grupo viridans y bacterias implicadas en infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria.



# 1. Introducción





## 1.1 Enfermedad Neumocócica Invasiva (ENI)

La enfermedad neumocócica es una infección potencialmente prevenible con vacunación causada por *Streptococcus pneumoniae*, también conocido como neumococo, una bacteria grampositiva que coloniza de forma asintomática la nasofaringe de niños y adultos, pero que también es la causa de un amplio espectro de manifestaciones clínicas [1]. La bacteria puede pasar de un estado de colonización asintomática a causar enfermedad localizada o enfermedad neumocócica invasiva (ENI). La enfermedad localizada es la forma más frecuente y se produce cuando la bacteria se extiende por contigüidad produciendo otitis o sinusitis [2]. La enfermedad neumocócica invasiva, aunque menos frecuente, se caracteriza por manifestaciones clínicas graves tras la diseminación de *S. pneumoniae* hacia vías respiratorias inferiores o por vía hematógena a territorio normalmente estéril [1]. La principal manifestación clínica de la ENI es la neumonía, seguida de otras menos frecuentes como meningitis, bacteriemias sin foco, artritis, sepsis o peritonitis [3, 4].

### 1.1.1 Morbilidad y mortalidad de la ENI

La morbimortalidad asociada a la ENI varía en función de diferentes factores como la edad, etnia, situación geográfica o estado de vacunación [5, 6]. Los niños menores de cinco años son una de las poblaciones con mayor morbimortalidad asociada a pesar de la existencia de vacunas neumocócicas [6]. *S. pneumoniae* es la principal causa de neumonía bacteriana en niños y se estima que en 2016 causó un total de 44 millones de episodios neumónicos que finalizaron con la muerte de 341 029 individuos en la franja de edad de menores de cinco años a nivel global [7]. *S. pneumoniae* también es la principal causa de meningitis en niños [8]. El riesgo de complicaciones que conducen a la muerte del individuo o que dejan secuelas es muy alto en esta manifestación, y por ello se considera un cuadro clínico importante, aunque menos prevalente, dentro de la ENI. En el año 2015 se estima que se produjeron más de 80 000 casos de meningitis neumocócica a nivel mundial con hasta 37 000 fallecidos entre niños menores de cinco años. Estas cifras reflejan una elevada tasa de letalidad, especialmente en el continente africano y en el sur de Asia [9].

### 1.1.2 Prevención de la ENI

La ENI es una enfermedad inmunoprevenible para la cual existen dos tipos de vacunas: las vacunas polisacáridas y las vacunas conjugadas [10]. El componente principal de estas vacunas es el polisacárido capsular extracelular de *S. pneumoniae*. Aunque existen al menos cien serotipos de neumococo distintos en función de este polisacárido capsular [11, 12], sólo un número reducido de ellos se han incluido en las vacunas neumocócicas; aquellos serotipos causantes de la mayor proporción de casos de ENI [10].

La vacuna neumocócica polisacárida, disponible desde 1980, protege contra veintitrés

serotipos de neumococo diferentes, pero produce poca inmunogenicidad en niños menores de dos años y su uso en esta franja de edad no es recomendable [10]. La unión de los polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae* a proteínas inmunogénicas, como la toxina diftérica, es la base de las vacunas conjugadas que aumentan la respuesta inmunitaria, especialmente en niños menores de dos años, e inducen memoria inmunológica [10]. Estas vacunas no sólo reducen el desarrollo de infección grave, sino que también reducen la colonización [13].

La primera vacuna neumocócica conjugada (VNC), la vacuna neumocócica conjugada 7-valente (VNC7), fue diseñada y aprobada en el año 2000 con acción frente a siete serotipos de neumococo prevalentes en los Estados Unidos como causa de ENI [14]. Fue la primera vacuna en introducirse en los calendarios de vacunación de muchos países y supuso una importante reducción de la incidencia de esta enfermedad por los serotipos incluidos en esta vacuna [6]. Sin embargo, casi a la vez se notificaron incrementos en el número de casos de ENI por serotipos no vacunales en la mayoría de países donde se había implementado [6, 15]. Esto implicó que la VNC7 fuese reemplazada paulatinamente por vacunas conjugadas con mayor valencia.

Las vacunas neumocócicas conjugadas 10-valente (VNC10) y 13-valente (VNC13) ampliaban el espectro de acción de VNC7 frente a serotipos adicionales frecuentes en otras zonas del mundo como Asia o África [16, 17], aunque el fenómeno de reemplazo de los serotipos causantes de ENI tampoco tardó en observarse tras su introducción en diferentes países [18, 19]. En julio de 2021, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, del inglés *U.S. Food & Drug Administration*) autorizó dos nuevas vacunas neumocócicas conjugadas contra 15 (VNC15) y 20 serotipos (VNC20) que aumentan todavía más ese espectro de acción [20, 21]. Además, actualmente se investigan estrategias de vacunación que inducen inmunidad en las mucosas para la prevención universal de todos los serotipos causantes de ENI [22, 23].

### 1.1.3 Diagnóstico de la ENI

El criterio definitivo para el diagnóstico de la ENI se basa en el aislamiento de neumococo en muestras normalmente estériles [24]. Sin embargo, el cultivo de muestras estériles para la detección de *S. pneumoniae* es lento y tiene baja sensibilidad, especialmente en el caso de neumonías neumocócicas y en niños menores de un año, probablemente debido a un acúmulo de circunstancias como volúmenes de sangre insuficientes, baja densidad del microorganismo en sangre o tratamiento antibiótico previo [25, 26]. Con el uso de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) o la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, del inglés

*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), algunas de estas limitaciones se han sobrevenido, puesto que son técnicas rápidas, capaces de trabajar con volúmenes de muestra pequeños, menos sensibles al uso de antibióticos y con mayor rendimiento diagnóstico que el cultivo tradicional [25, 27–29]. Algunos de los genes diana más utilizados para la detección de neumococo son el gen de la autolisina (*lytA*), del transportador *piaABC* (*piaB*), del fragmento *Spn9808* (*Spn9808*) y el gen regulador de la transcripción (*Spn2020*), con especificidad del 100% para *S. pneumoniae* [30]. La rapidez y robustez de las técnicas moleculares ha hecho que la Organización Mundial de la Salud (OMS) también incluya como criterio definitivo de ENI la detección de ácidos nucleicos de *S. pneumoniae* en muestras normalmente estériles [31].

El uso de muestras del tracto respiratorio superior para el diagnóstico de ENI es controvertido debido a la dificultad para distinguir colonización o enfermedad, especialmente en población infantil con elevadas tasas de portadores [1]. No obstante, algunos estudios han sugerido que la densidad de neumococo en nasofaringe sí que podría tener valor diagnóstico, al observar mayor carga neumocócica en nasofaringe asociada a niños con neumonía neumocócica y otras manifestaciones de la ENI en comparación con niños sanos [32–34]. Esta asociación, aunque interesante, no se observa en todos los estudios [35, 36]. En cuanto al uso de muestras del tracto respiratorio inferior para el diagnóstico de neumonía, la obtención de esputos de buena calidad en niños pequeños no es factible y, por tanto, se limita su utilidad a niños mayores y población adulta [37]. Como consecuencia, el diagnóstico de ENI en la población de menor edad recae en el uso de muestras estériles que se obtienen vía procedimientos invasivos y que sólo se recomiendan en aquellos pacientes con enfermedad grave y/o que no responden al tratamiento antibiótico [38, 39]. Este hecho probablemente impacte en un infra diagnóstico de la enfermedad y en una menor eficiencia de las estrategias de vigilancia, y pone de manifiesto la necesidad de generar nuevas herramientas no invasivas que faciliten el diagnóstico microbiológico de la ENI [26, 40].

#### **1.1.4 Tratamiento antibiótico de la ENI**

Los antibióticos constituyen el principal pilar para el tratamiento de la ENI. Clásicamente, las infecciones por *S. pneumoniae* se han tratado con penicilina, antibiótico descubierto por Alexander Fleming en el año 1928 [41]. Durante los años cuarenta, la penicilina se empezó a producir y comercializar de forma masiva y se utilizó ampliamente para el tratamiento de las infecciones neumocócicas hasta la aparición de resistencias en la década de 1960 [42].

A lo largo de los años, modificaciones de la molécula original de la penicilina han dado lugar a una serie de antibióticos, incluyendo cefalosporinas y carbapenémicos, que amplían el espectro de actuación de la penicilina y que conservan cierta actividad frente

a cepas de neumococo resistentes a penicilina. Todos ellos se incluyen en la familia de antibióticos betalactámicos y actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la fijación a las proteínas de unión a la penicilina (PBPs, del inglés *Penicillin-Binding Proteins*) [43, 44]. Las PBPs son enzimas ancladas a la membrana bacteriana que catalizan los enlaces covalentes en los últimos pasos de la biosíntesis de peptidoglicano, un elemento estructural vital para neumococo [45].

Actualmente, los antibióticos betalactámicos constituyen el tratamiento de elección para neumococo. Sin embargo, diferentes dosis, duración y vías de administración se establecen de acuerdo con las características clínicas y personales del paciente. Además, el tratamiento de la ENI suele iniciarse de forma empírica y en ausencia de una prueba de susceptibilidad antibiótica, lo que implica que otros factores adicionales deban considerarse a la hora de establecer una terapia antibiótica adecuada, como la localización de la infección, la epidemiología local y los patrones de resistencia de los patógenos causantes de los diferentes cuadros clínicos [38, 39, 46, 47]. Por ello, en ocasiones se utilizan antibióticos de amplio espectro que impactan negativamente en la generación de resistencias y la modificación del microbioma del huésped [48].

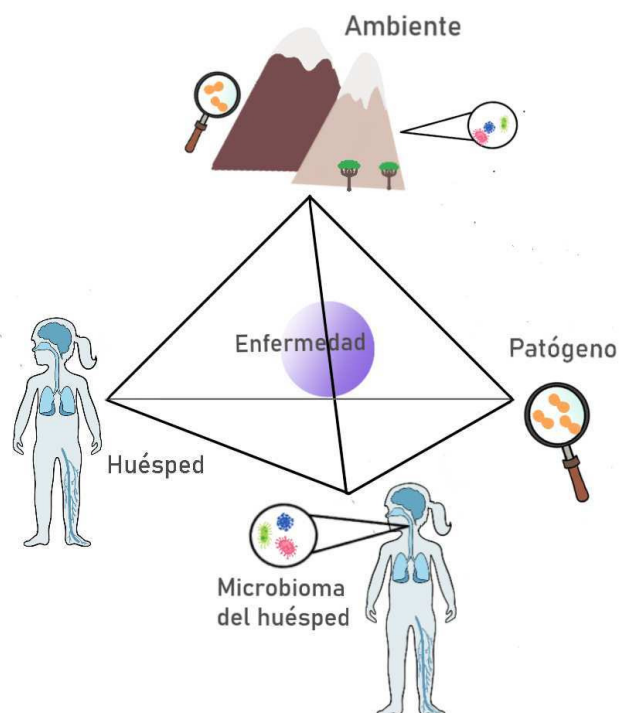
En los últimos años, la emergencia y expansión de cepas de neumococo resistentes a penicilina y otros antibióticos se considera una amenaza de salud pública global. Tanto es así que en el año 2017 la OMS incluyó a *S. pneumoniae* como uno de los doce patógenos prioritarios y renovó el interés en su vigilancia, prevención y tratamiento [49]. Los mecanismos de resistencia a betalactámicos en neumococo se basan en la alteración de las PBPs, cambiando su estructura y disminuyendo así la afinidad a estos antibióticos [50]. Estos cambios estructurales se producen, principalmente, como consecuencia de recombinaciones fruto de la adquisición de material genético de otros neumococos y especies de estreptococos comensales, como *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*, con los que comparte nicho ecológico [44, 51, 52]. Específicamente, los niños podrían jugar un papel importante en la emergencia y expansión de cepas de neumococo resistentes a toda la población debido a las elevadas tasas de portadores, la mayor duración de la colonización que en adultos, el gran número de prescripciones antibióticas por episodios de infección respiratoria aguda y el hecho de que constituyen los principales vectores de transmisión de neumococo [1, 5, 53, 54].

### 1.1.5 Factores de riesgo asociados a la ENI

La colonización nasofaríngea precede a la ENI y es una condición indispensable para el desarrollo de la infección [1]. El paso de colonización a causar infección suele ocurrir poco tiempo después de la adquisición de una nueva cepa de neumococo y es raro que se

produzca tras períodos prolongados de colonización asintomática [55]. Se estima que la edad de adquisición de la primoinfección por neumococo es muy temprana, entre las primeras semanas de vida y los seis meses, y que a la edad de dos años una elevada proporción de niños han sido colonizados en algún momento por algún serotipo de *S. pneumoniae*, llegando a ser del 95% en algunos estudios [1, 55–57].

A pesar de las elevadas tasas de portadores descritas durante la infancia, la enfermedad invasiva se desarrolla en un número reducido de individuos. Clásicamente, para explicar esta susceptibilidad diferencial, así como las diferencias en las manifestaciones clínicas y evolución de la enfermedad, se ha recurrido al complejo fenómeno de la tríada epidemiológica en el desarrollo de las enfermedades infecciosas [58]; la adquisición de *S. pneumoniae*, la colonización, el desarrollo de la infección y la gravedad de la infección, así como también la duración y la recuperación o bien la muerte del individuo, serían el resultado de una compleja interacción entre factores propios del huésped, del patógeno y factores ambientales.



**Figura 1: Teoría de la pirámide.** La enfermedad como resultado de la interacción entre cuatro tipos de factores: factores propios del patógeno, del huésped, del ambiente y del microbioma del huésped (Figura adaptada de la revista *Trends in Parasitology* [59]).

En los últimos años, y a partir de los estudios de secuenciación masiva, se ha observado que los microorganismos que cohabitan con el ser humano también podrían jugar un papel importante en la patogénesis de múltiples enfermedades [60–62]. Tanto es así que han surgido nuevos modelos teóricos como base para el estudio de las complejas dinámicas

de las enfermedades. En concreto, Bernardo-Cravo *et al.* [59] sugirieron que el desarrollo de las enfermedades infecciosas es en realidad el resultado de la compleja interacción entre una tétrada de factores. En dicho trabajo contemplaron el microbioma del huésped como el cuarto factor e ilustraron las relaciones entre los diferentes factores con una pirámide en lugar del clásico triángulo [59] (Figura 1).

### 1.1.5.1 Factores de virulencia de *S. pneumoniae*

Diferentes proteínas de superficie y estructuras bacterianas de *S. pneumoniae* juegan un rol vital en la patogénesis de la ENI. Estas proteínas y estructuras previenen el aclaramiento de *S. pneumoniae* durante la colonización nasofaríngea, y bloquean y ayudan a evadir la respuesta inmunitaria del huésped durante la enfermedad [63], como la proteína de superficie pspA [64], la proteasa IgA [65], la neumolisina [66], la autolisina [67] o el polisacárido capsular [68].

El polisacárido capsular es el mayor determinante del potencial invasivo de neumococo. Este polisacárido se une de forma covalente a la capa superficial de la pared celular de peptidoglicano de neumococo y forma una capa adicional que lo envuelve y lo separa del ambiente [69]. La presencia de esta cápsula facilita la colonización nasofaríngea de *S. pneumoniae* y le confiere protección frente a los mecanismos opsonofagocíticos del sistema inmune del huésped [68]. Aunque existe un elevado número de serotipos de neumococo distintos en función de este polisacárido capsular [11, 12], no todos presentan la misma eficacia para causar ENI; se distinguen serotipos frecuentemente asociados a portadores y otros serotipos como causa frecuente de enfermedad [70–72].

Otra característica importante de neumococo es la gran diversidad y adaptabilidad genética que les caracteriza y les permite montar una respuesta rápida frente a ambientes fluctuantes y diversos como el antibiótico y la inmunidad inducida por la vacunación. Mediante fenómenos de conjugación, transducción y, principalmente, transformación son capaces de adquirir e incorporar en su genoma determinantes genéticos de virulencia y de resistencia presentes en otras cepas de neumococo, e incluso en otras especies relacionadas como *S. mitis*, *S. oralis* o *Streptococcus infantis*, con elevada frecuencia [52, 73, 74].

### 1.1.5.2 Factores del huésped

Los factores asociados al individuo que incrementan la susceptibilidad a la ENI están relacionados, en mayor o menor grado, con la capacidad del sistema inmune del huésped de impedir la colonización, sobrecrecimiento, expansión e invasión de *S. pneumoniae*. La vacunación y la edad son dos factores críticos. La incidencia de la enfermedad es mayor entre individuos no vacunados [6, 10], así como en individuos mayores de 65 años y niños menores de cinco años, y particularmente entre aquellos menores de un año [75]. En

estos últimos, la frecuente exposición a *S. pneumoniae*, las elevadas tasas de colonización y la inmadurez de su sistema inmune son algunos de los motivos que podrían explicar la susceptibilidad diferencial a la infección grave [1, 76]. Asimismo, existen mutaciones genéticas raras y/o polimorfismos comunes que determinan diferentes defectos en el sistema inmune del huésped que facilitan el desarrollo de ENI, como la deficiencia sérica de la lectina de unión a manosa (MBL, del inglés *Mannose-Binding Lectin*) [77]. Otras anomalías anatómicas, terapias inmunosupresoras y comorbilidades también se han asociado a la ENI [78].

### 1.1.5.3 Factores ambientales

Las condiciones ambientales también tienen un papel importante en el desarrollo de infección invasiva por *S. pneumoniae*. La polución, las bajas temperaturas y los bajos niveles de humedad relativa se han asociado temporalmente con mayor incidencia de ENI [79, 80]. Algunos factores socioeconómicos también incrementan la susceptibilidad a la ENI, como la asistencia a guardería durante los primeros meses de vida o tener hermanos [81] y la sobrepoblación o el hacinamiento [82]. Además, la falta de lactancia materna [83, 84], dietas deficientes en nutrientes [85] y la exposición al humo del tabaco se han asociado significativamente a la ENI [84, 86]. Algunos de los mecanismos por los cuales estos factores incrementan el riesgo de ENI son conocidos, pero otros aún están pendientes de dilucidar.

### 1.1.5.4 Microbiota humana

De acuerdo con la definición original del término microbioma introducida por Whipps *et al.* [87] en el año 1988, el microbioma humano es el conjunto de microorganismos o comunidades microbianas que ocupan un hábitat relativamente bien definido, como el cuerpo humano, así como también sus metabolitos, estructuras microbianas, elementos genéticos móviles (transposones, fagos y virus) y ácidos nucleicos libres en el ambiente, que contribuyen a la generación de nichos ecológicos específicos con distintas propiedades físico-químicas y distintas funcionalidades [87].

Tres décadas después, y tras el avance de las tecnologías ómicas que han generado gran cantidad de nueva información sobre el microbioma en diferentes áreas de investigación, esta definición sigue siendo válida, aunque Berg *et al.* [88] la amplían resaltando dos aspectos importantes; por un lado, el carácter dinámico del microbioma humano, que tiende a cambiar en tiempo y escala, mientras que, por otro lado, enfatizan las diferencias entre los términos microbioma y microbiota. A pesar de que muchas veces son utilizados indistintamente, ambos términos expresan dos conceptos diferentes con cierto solapamiento. El concepto de microbiota humana hace referencia específicamente al conjunto de microorganismos que habitan el cuerpo humano, por tanto, es una parte del microbioma humano [88].

Este conjunto de microorganismos se corresponde, principalmente, con una intrincada red de bacterias [89], pero también arqueas [90], protozoos [91], hongos [92], virus [93] y otros microorganismos [88]. Si bien etimológicamente existe cierta discusión sobre la interpretación de virus como miembros de la microbiota humana dado que no se trata de microorganismos vivos, muchos autores defienden su inclusión debido a la importancia de éstos en la salud humana [88].

Las comunidades bacterianas son unas de las comunidades microbianas más estudiadas, aunque cada vez es más frecuente el estudio de hongos, virus y otros microorganismos, que conjuntamente ofrecen una visión mucho más completa del microbioma humano. El número exacto de bacterias que residen en nuestro cuerpo se desconoce, sin embargo, se han realizado estimaciones que sugieren que sería parecido, o incluso mayor, al número de células humanas [94, 95]. Poseen, además, una gran diversidad genética con más de 46 millones de genes bacterianos identificados en comparación con los 20 500 genes del genoma humano [89, 96]. Estos genes bacterianos parecen tener una función esencial en la homeostasis del cuerpo humano y por ello se han llegado a considerar como el segundo genoma humano [97].

Durante las últimas décadas, el estudio del microbioma humano se ha centrado en la investigación de las bacterias que habitan la mucosa intestinal, implicadas en funciones diversas como la digestión de nutrientes, el metabolismo de medicamentos, la maduración del sistema inmune e inmunomodulación, así como la protección frente a patógenos [98]. No es extraño, entonces, que desviaciones de un microbioma intestinal equilibrado y saludable se hayan relacionado con múltiples condiciones patológicas clínicas [61].

Con la aparición de las técnicas de secuenciación masiva se ha podido describir la existencia de comunidades microbianas específicas con funciones diversas y adaptadas a las condiciones de casi cada rincón del cuerpo humano, incluyendo la piel [99], la vagina [100] y también el tracto respiratorio [101, 102]. Aunque los datos recopilados en cuanto al microbioma respiratorio son significativamente menores, los estudios realizados hasta ahora también sugieren un papel determinante de éste en la modulación de la inmunidad local y en la salud respiratoria del individuo. Ya se ha desvelado una estrecha relación entre perturbaciones de la microbiota del tracto respiratorio con el inicio y la progresión de respuestas inflamatorias en enfermedades de carácter crónico, como el asma o la rinosinusitis crónica, así como también se han relacionado con la gravedad y exacerbaciones de la fibrosis quística y otras enfermedades como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [60, 62, 103]. En los últimos años, además, se está investigando con especial interés el papel de estas comunidades microbianas en la patogénesis de la infección



respiratoria aguda y algunas evidencias sugerirían un rol importante de la microbiota respiratoria en la prevención o el desarrollo de ENI.

## 1.2 Microbiota del tracto respiratorio superior

El tracto respiratorio, conformado por el tracto respiratorio superior e inferior, es un sistema de órganos complejo cuya función esencial es el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en un proceso llamado respiración. El tracto respiratorio superior comprende la nariz, fosas nasales, la cavidad oral y la faringe (nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), mientras que el tracto respiratorio inferior incluye la laringe, tráquea y pulmones (bronquios, bronquiolos, conducto alveolar y alvéolos) [104].

Clásicamente se pensó que el pulmón era estéril en ausencia de infección, pero las técnicas moleculares y el gran número creciente de estudios que detectan bacterias comensales y otros microorganismos en las vías respiratorias inferiores de individuos asintomáticos han permitido rebatir esta hipótesis poco fundamentada [60, 101]. Por su parte, el tracto respiratorio superior ha recibido más atención, dada la facilidad de obtención de muestras, y ya se conocía de la existencia de una microbiota comensal asociada a las vías respiratorias superiores [105, 106].

Los estudios con secuenciación masiva han permitido aumentar el conocimiento sobre la relación de estos microorganismos entre ellos y con el hábitat en el que conviven, confirmando la existencia de nichos ecológicos bien definidos a lo largo de todo el tracto respiratorio [107]. El término de nicho ecológico hace referencia a un concepto abstracto que engloba las especies que ocupan un hábitat determinado y el medio abiótico (condiciones ambientales como la temperatura, pH, oxígeno, etc.) y biótico en el que se envuelven (las interacciones con otros microorganismos y células) [108, 109].

Específicamente, la nasofaringe es uno de los nichos ecológicos del tracto respiratorio más estudiados, no sólo por su accesibilidad, sino también porque presenta una posición estratégica entre el tracto respiratorio superior e inferior, constituye la puerta de entrada de numerosos patógenos primarios y el hábitat de bacterias clásicamente consideradas patobiontes o actualmente denominadas bacterias con potencial patogénico [110], como *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* [111].

La composición de la microbiota del tracto respiratorio superior, incluyendo la colonización por estas bacterias potencialmente patógenas, evoluciona rápidamente durante la infancia y experimenta cambios continuos hasta el desarrollo de una estructura microbiana relativamente estable a los dos años de vida [112, 113]. Se desconoce el tiempo necesario

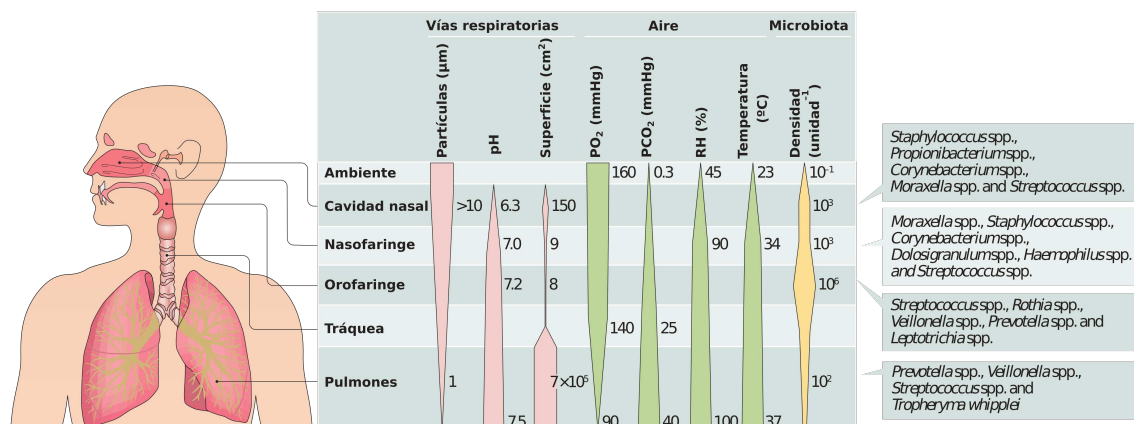
para la maduración de estas comunidades microbianas en perfiles de microbiota típicos de poblaciones adultas. En la microbiota intestinal, este proceso se completa alrededor de los tres años de vida [114], sin embargo, no existen estudios que permitan determinar la duración de este proceso en el caso de la microbiota respiratoria. En el estudio de Ho Man *et al.* [115] observaron una composición de microbiota nasofaríngea en niños de seis años similar a la de niños entre uno y dos años, si bien se trataba de niños prematuros que podrían tener un retraso en la maduración de la microbiota respiratoria en comparación con niños nacidos a término [112, 113, 115]. Lo que sí parece más claro es que los patrones de colonización y sucesión ecológica en los dos primeros años de vida parecen tener una relación con la salud respiratoria del individuo en etapas posteriores [112, 113, 116].

### **1.2.1 Desarrollo de la microbiota del tracto respiratorio superior; factores que modulan su estabilidad y equilibrio en edades tempranas de la vida**

Recientemente se ha sugerido la posibilidad de que la adquisición de los primeros microorganismos por parte del bebé se produzca en el útero de la madre [117, 118], aunque esta hipótesis es controvertida debido al análisis de muestras de baja biomasa fácilmente contaminables como la placenta [119, 120]. A la espera de estudios que permitan corroborar o rechazar esta hipótesis, las evidencias actuales apuntan a que el primer contacto directo con microbios se produce al nacer. La colonización del tracto respiratorio ocurre en las primeras horas de vida, con una mezcla de bacterias de origen entérico, vaginal, de la piel y, probablemente, también del ambiente [121, 122]. Estas comunidades iniciales son muy inestables y rápidamente se desarrollan desde una microbiota propia de la madre/ambiente a perfiles de microbiota específicos de cada nicho respiratorio [112].

La distribución de las bacterias a lo largo del tracto respiratorio es nicho-específica, pero también presenta cierta contigüidad. La densidad de bacterias asociadas a cada nicho también cambia y se reduce progresivamente desde el tracto respiratorio superior al inferior [62, 107]. Las comunidades bacterianas rápidamente se adaptan a las particularidades físico-químicas de cada espacio incluyendo diferencias en la temperatura, pH, humedad, disponibilidad de oxígeno, factores inmunológicos, nutrientes y otras características [62, 107] (Figura 2). Pero estas especies no sólo se adaptan pasivamente a las condiciones de cada nicho, sino que también contribuyen activamente a modificarlas [109]. Estas interacciones bidireccionales han determinado la coevolución y coadaptación de los microorganismos con el ser humano durante millones de años. Así, cada individuo presenta bacterias de ciertos géneros y familias que se encuentran en el mismo tiempo y espacio en algunos o muchos individuos realizando funciones similares, aunque a nivel de especie y de cepas la microbiota de un individuo puede ser tan única como la huella dactilar, lo que posiblemente refleje

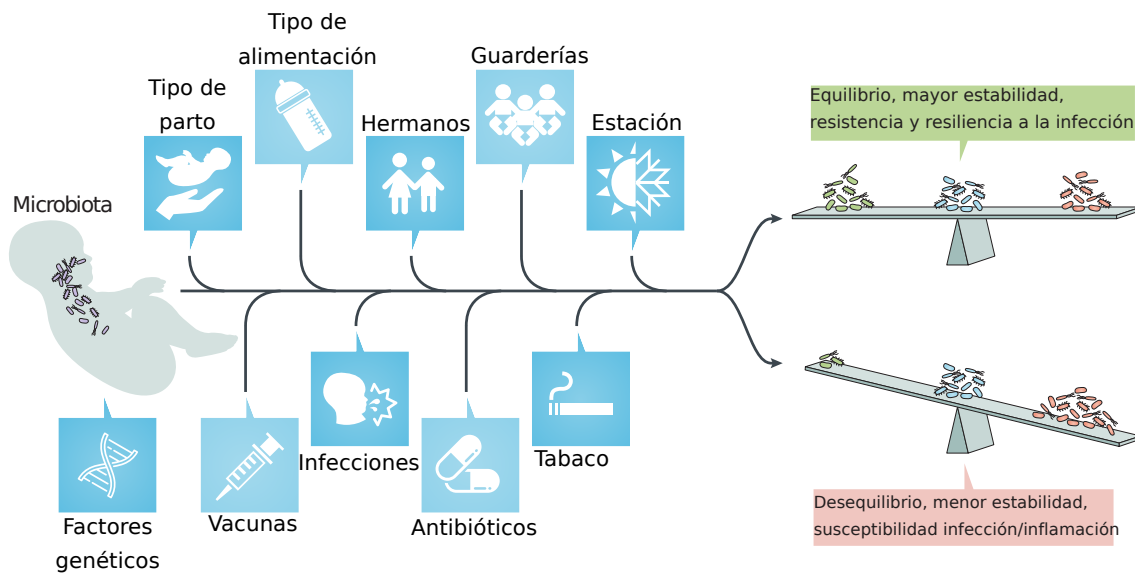
características y condiciones específicas del individuo [107, 123, 124] (Figura 2).



**Figura 2: Gradientes fisiológicos y microbianos en el tracto respiratorio.** Existen diferencias en el pH, la presión parcial de oxígeno ( $\text{pO}_2$ ) y dióxido de carbono ( $\text{pCO}_2$ ), la humedad relativa (RH), la temperatura y la superficie de los diferentes nichos. También existen diferencias en el alcance de las partículas inhaladas (que contienen bacterias y virus) en función de su tamaño. Estas características son las que determinan el crecimiento nicho-específico, así como la densidad de bacterias colonizando cada nicho (Figura extraída y adaptada de la revista *Nature Reviews Microbiology* [107]).

Durante los primeros meses de vida, en la microbiota nasofaríngea predominan géneros como *Corynebacterium*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Dolosigranulum* y *Haemophilus* [62]. Se ha descrito que tan pronto como a las seis semanas desde el nacimiento existen diferentes perfiles de microbiota nasofaríngea dominados por algunos de estos géneros con patrones de estabilidad y cambio diferentes durante los primeros dos años [112]. Los perfiles de microbiota caracterizados por *Corynebacterium-Dolosigranulum* y *Moraxella* se han correlacionado con composiciones bacterianas más estables y salud respiratoria. Estudios preliminares han mostrado que, en los perfiles de microbiota dominados por estas bacterias, la colonización por géneros como *Streptococcus* o *Haemophilus* se reduce. Este hecho sugiere un efecto protector de la microbiota comensal a la colonización por especies con potencial patógeno como *S. pneumoniae* o *H. influenzae* [112]. No obstante, la literatura no es unánime y diferentes autores han descrito que la colonización temprana de la nasofaringe por *Moraxella* se asociaría a un aumento de las infecciones respiratorias en el primer año de vida [116, 125] o, también, han reportado la asociación de *Dolosigranulum* con la coinfección por el virus de la gripe en adultos y como causa de infección oportunista en mayores de 65 años y niños menores de dos años [126–128]. Estos resultados contradictorios enfatizan la falta de conocimiento sobre las complejas relaciones que establecen los miembros de la microbiota respiratoria humana entre ellos, con el patógeno, el huésped y el ambiente a la hora de causar, o no, enfermedad respiratoria. Además, posiblemente, la resolución a nivel de género de estos estudios contribuya a la variabilidad observada, ya que este nivel de resolución impide distinguir especies patógenas, como *M. catarrhalis*, de otras comensales, un fenómeno común en los estudios de secuenciación de amplicones del gen de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16S.

Numerosos factores son los que se han relacionado con el desarrollo de una microbiota



**Figura 3: Factores moduladores.** Factores que influyen en el desarrollo de la microbiota del tracto respiratorio superior en edades tempranas de la vida (Figura extraída y adaptada de la revista *Nature Reviews Microbiology* [107]).

protectora o de riesgo en el tracto respiratorio superior en etapas tempranas de la vida (Figura 3) [107, 113]. No sólo la exposición a microbios beneficiosos es importante, sino también el tiempo en el que se produce esa exposición parece tener consecuencias en la salud respiratoria a largo plazo [107, 113]. En este sentido, la lactancia materna o el parto vaginal se han descrito como factores que podrían equilibrar la balanza hacia el desarrollo de una microbiota respiratoria saludable, frecuentemente relacionada con elevados niveles de diversidad [121, 122, 129]. Una microbiota respiratoria diversa es sinónimo de una microbiota rica en bacterias que conviven de forma equilibrada y que parece tener mayor resistencia y resiliencia frente a todos aquellos fenómenos que la perturban, como las infecciones [130]. La vacunación contra patobiontes respiratorios también podría ejercer efectos beneficiosos en la microbiota del huésped. Ya se ha descrito la reducción de la colonización por los serotipos incluidos en las vacunas como un efecto beneficioso [13], pero se ha de indagar en el impacto de estas vacunas en el resto de microbiota comensal.

La adquisición de virus, probablemente a través de la asistencia a guarderías [131], o la toma de antibióticos son eventos frecuentes en niños relacionados con un desequilibrio temporal de la microbiota respiratoria asociado con mayor susceptibilidad a la infección e inflamación [107, 113]. El término disbiosis se ha utilizado frecuentemente en la literatura para referirse a dichos estados desequilibrados o alterados de la microbiota relacionados con la patogénesis de múltiples enfermedades. La disbiosis, además, suele hacer referencia a la pérdida de diversidad, caracterizada por la reducción de la microbiota comensal y el aumento de bacterias en menor abundancia, aunque no existe una definición clara de este

estado disbiótico de la microbiota ni medidas que permitan cuantificar su contribución a la salud del individuo [132].

### 1.2.1.1 Alimentación y tipo de parto

La leche humana es una fuente esencial de macronutrientes, micronutrientes y moléculas bioactivas cuya concentración varía de acuerdo con múltiples factores y se adapta a las necesidades del bebé. Globalmente, la composición compleja y dinámica de la leche humana promueve el crecimiento y desarrollo sano del bebé [133]. Organizaciones internacionales como la OMS recomiendan la lactancia materna exclusiva al menos durante los seis primeros meses de vida [134].

Recientemente, se ha sumado a esta lista de factores beneficiosos la presencia de microorganismos en la leche materna que son esenciales para el correcto funcionamiento y homeostasis del microbioma intestinal. A través de estudios basados en cultivo, y otros mediante técnicas moleculares, se ha conseguido identificar la presencia de más de 800 taxones distintos en la leche materna humana; principalmente bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*, pero también bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium*, bacterias de la piel como *Propionibacterium* y otras bacterias gramnegativas. Estas bacterias no sólo tienen un papel importante en la colonización intestinal (aproximadamente el 25-30% de la microbiota intestinal deriva de la leche materna), sino que además intervienen en la maduración del sistema inmunitario de la mucosa gastrointestinal, facilitan la digestión de nutrientes e inhiben el crecimiento patogénico de microorganismos [135].

El rol de la lactancia materna en la colonización del tracto respiratorio y su funcionamiento es más incierto, con un número reducido de estudios abordando esta temática. Por un lado, la lactancia materna se ha relacionado con una menor frecuencia, duración y gravedad de las infecciones respiratorias en edades tempranas [83]. Por otro lado, Biesbroek *et al.* [129] observaron que la microbiota nasofaríngea de niños con seis semanas de vida alimentados con lactancia materna exclusiva estaba enriquecida en géneros como *Dolosigranulum* y *Corynebacterium*, mientras que la nasofaringe de niños de la misma edad alimentados con lactancia artificial presentaba mayor abundancia de *Staphylococcus* y géneros anaerobios como *Veillonella* y *Prevotella* [129]. Más tarde, Drago *et al.* [136] detectaron la presencia de *Dolosigranulum* spp. en el calostro y leche madura de un grupo reducido de madres lactantes en Burundi e Italia [136]. Estos resultados indican que la leche materna podría modular la susceptibilidad a la infección respiratoria mediante la provisión de bacterias potencialmente beneficiosas, como *Dolosigranulum*, en etapas muy tempranas de la vida [112].

De igual forma, el parto vaginal se ha relacionado con un impacto positivo en la estabilidad

de la microbiota del tracto respiratorio superior durante los primeros meses de vida y en una mayor colonización con bacterias saludables en comparación con los niños nacidos por cesárea [121, 122], si bien es cierto que el estudio de Chu *et al.* [137] indica que estas diferencias serían sutiles e indetectables a partir de las seis semanas y que, por tanto, las diferencias entre niños nacidos por cesárea o parto vaginal se normalizarían posteriormente [137]. El interés en este tema ha sido tal que algunos grupos de investigación recomendaron la transferencia de microbiota vaginal de la madre al recién nacido como estrategia para restaurar la microbiota de diferentes nichos de los niños nacidos por cesárea. Los resultados, sin embargo, fueron variables y con evidencia científica baja [138, 139].

### 1.2.1.2 Vacunación

Las vacunas han conseguido reducir la morbimortalidad infantil de múltiples enfermedades infecciosas, incluyendo las infecciones del tracto respiratorio causadas por bacterias potencialmente patógenas que colonizan la nasofaringe de niños, como *S. pneumoniae* y *H. influenzae* [6, 140]. El desarrollo de vacunas conjugadas contra estas bacterias ha permitido la prevención de la enfermedad, pero también la reducción de la colonización en nasofaringe por los serotipos incluidos en estas vacunas [13, 141]. Este efecto en el nicho ecológico también provoca cambios en la abundancia de serotipos no vacunales y otras bacterias potencialmente patógenas con las que comparten nicho, como *Staphylococcus aureus* y *M. catarrhalis* [142–144], probablemente como consecuencia de las relaciones de competencia o de sinergia establecidas entre ellos [145].

Sin embargo, no está tan claro si las vacunas neumocócicas conjugadas y otras vacunas tienen un efecto más generalizado sobre la microbiota respiratoria comensal. Estudios con secuenciación masiva han tratado de aportar una visión más amplia de los cambios que ocurren en el tracto respiratorio superior de niños tras la vacunación. En el estudio transversal de Salgado *et al.* [146] observaron una composición de microbiota nasofaríngea muy similar en niños brasileños de entre seis y veintitrés meses de edad con infección respiratoria aguda vacunados con VNC10 y no vacunados, y concluyeron que la vacunación tiene un efecto específico sobre los serotipos de neumococo incluidos en la vacuna, pero no en el resto de bacterias comensales [146]. Otro estudio aleatorizado en Fiji estudió el efecto de la vacunación con pauta de tres dosis de VNC7 en la microbiota nasofaríngea de niños de doce meses, también sin resultados significativos [147]. Por el contrario, en el estudio aleatorizado de Biesbroek *et al.* [148] sí que observaron un aumento de la diversidad en la microbiota nasofaríngea de niños holandeses a los doce meses de edad tras la vacunación con tres dosis de VNC7, principalmente debido al aumento de otras especies de estreptococos comensales y de géneros anaerobios como *Veillonella*, *Prevotella*, *Fusobacterium* o *Leptotrichia*, algunos de ellos relacionados con otitis y otras enfermedades [148]. Asimismo, se ha descrito un aumento de la diversidad en la microbiota

nasal que coincide con una menor colonización por neumococo en niños suizos menores de doce meses vacunados con dos dosis de VNC13 en comparación con aquellos vacunados con VNC7 [149].

Otras vacunas también provocan cambios en la composición de la microbiota del tracto respiratorio superior. Por ejemplo, la vacuna contra el virus de la gripe en adultos se ha relacionado con un aumento en la abundancia de los géneros *Staphylococcus* y *Bacteroides*, así como con la alteración de la expresión génica del epitelio nasal. Estos cambios se han relacionado con la reducción de la actividad bactericida y el incremento de bacterias potencialmente patógenas, similar a lo descrito en el curso natural de la infección [150].

En conjunto, las evidencias sobre el efecto de la vacunación en la microbiota respiratoria son contradictorias, probablemente debido a múltiples factores como el tipo de vacuna, tiempos de administración, edad del individuo o situación geográfica. Además, el posible impacto de estas modificaciones descritas en la salud infantil es aún desconocido.

### 1.2.1.3 Antibióticos

La población pediátrica es una de las poblaciones con mayor número de prescripciones antibióticas debido, principalmente, a la gran carga de infección respiratoria aguda [53, 54]. No obstante, a pesar de que los antibióticos son valiosas herramientas para combatir estas infecciones, también pueden producir efectos nocivos duraderos para el huésped al alterar la composición y las funciones del microbioma.

La emergencia de patógenos resistentes a múltiples fármacos constituye uno de los efectos colaterales más preocupantes. El tratamiento antibiótico previo, la duración, la frecuencia, así como la prescripción de un tratamiento antibiótico inadecuado constituyen factores de riesgo para la selección y desarrollo de resistencias en bacterias patógenas del tracto respiratorio como neumococo [151, 152], cuya resistencia a múltiples fármacos es considerada un problema serio [49]. Además, la preocupación se extiende al desarrollo de resistencias en bacterias comensales que podrían perdurar durante años [153] y transmitirse por fenómenos de intercambio genético a bacterias potencialmente patógenas como *S. pneumoniae* [52].

Otros efectos como la pérdida transitoria/persistente de bacterias específicas, cambios en la abundancia bacteriana, pérdida de la resistencia a la colonización o cambios en los niveles generales de diversidad de la microbiota respiratoria se han descrito alguna vez como asociados al consumo de antibióticos en niños. Por ejemplo, Koff *et al.* [154] observaron modificaciones significativas en la microbiota de niños con infección del tracto respiratorio inferior de origen comunitario durante el tratamiento antibiótico endovenoso con

amoxicilina/ácido clavulánico, combinado con intubación y ventilación mecánica. En este estudio, los perfiles de microbiota respiratorios en el momento de la intubación, dominados por los géneros *Moraxella* o *Haemophilus*, cambiaron a perfiles pre-extubación, dominados por bacterias típicamente resistentes [154]. También se ha descrito la reducción de géneros con especies típicamente comensales, como *Corynebacterium* y *Dolosigranulum*, en el tracto respiratorio superior de niños sanos con historia de consumo antibiótico en los meses previos [113, 116, 155–157]. Teo *et al.* [116] no sólo observaron la reducción de *Dolosigranulum* y *Corynebacterium* en nasofaringe de niños sanos asociada al consumo antibiótico previo, sino también el aumento de géneros como *Streptococcus*, *Moraxella* y *Haemophilus*. Estos géneros, a su vez, se relacionaron con un riesgo incrementado de infección severa en el estudio de Teo *et al.* [116], de forma que los autores sugirieron que el antibiótico podría actuar como disruptor del equilibrio y los patrones de colonización asintomática de bacterias potencialmente patógenas como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *M. catarrhalis* [116]. Además, la colonización muy temprana de *S. pneumoniae* seleccionada por la exposición antibiótica se ha relacionado con mayor riesgo de desarrollar asma en el futuro y también podría tener un papel en el desarrollo de otitis media aguda [116, 156]. Estos hallazgos sugieren que los antibióticos podrían tener consecuencias negativas en la salud respiratoria del individuo a corto/largo plazo a través de las modificaciones de la microbiota respiratoria [116, 156].

Otros estudios describen fenómenos opuestos a los explicados anteriormente. Salter *et al.* [158] observaron la reducción de *Moraxella* y el aumento de secuencias asignadas a los géneros *Dolosigranulum* y *Brachybacterium* en la nasofaringe de niños con neumonía tras cursos de siete días de amoxicilina [158]. En el estudio de Zhou *et al.* [159] también observaron una reducción del género *Moraxella* y de la carga bacteriana total en la cavidad nasal de niños menores de un año tras el tratamiento con azitromicina endovenosa durante catorce días para la bronquiolitis por virus respiratorio sincitial (VRS). Esta reducción de *Moraxella* se correlacionó con un menor riesgo de desarrollar sibilancias recurrentes posteriores y una mayor salud respiratoria [159].

El impacto de los antibióticos en la microbiota respiratoria es significativo, aunque también notable la elevada variabilidad en función del tipo de antibiótico, la duración, la vía de administración, la enfermedad y otros múltiples factores. La bibliografía actual no aporta evidencias sobre los cambios producidos en la microbiota respiratoria de niños con ENI sometidos a tratamiento antibiótico.

### 1.2.1.4 Infección viral

Los virus respiratorios humanos, como rinovirus, VRS o virus de la gripe, replican principalmente en nasofaringe y parecen tener un rol importante en la colonización de la



nasofaringe por bacterias con potencial patógeno, como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *S. aureus*, así como también en la transición de estas bacterias de estado de portador asintomático a causar infección local o invasiva y sobreinfección bacteriana [160].

Los primeros datos sobre interacciones entre virus y bacterias en la patogénesis de las infecciones datan de la epidemia de la gripe española en el año 1918-1919. La interacción sinérgica del virus de la gripe A(H1N1) y *S. pneumoniae* es una de las más conocidas asociada a la muerte de millones de individuos como consecuencia de una infección viral seguida de neumonía bacteriana secundaria [161]. No sólo el virus de la gripe incrementa la susceptibilidad a la colonización y enfermedad por neumococo, sino que se han descrito interacciones entre neumococo y numerosos virus respiratorios como VRS, adenovirus, coronavirus o metaneumovirus [162]. Las interacciones de virus respiratorios con otras bacterias, como *S. aureus* y *H. influenzae*, también son frecuentes. Algunos de los mecanismos por los cuales los virus influyen en la colonización e invasión bacteriana incluyen la alteración de la función de la barrera epitelial respiratoria, la facilitación de la unión de bacterias a este epitelio o la modulación de la respuesta innata y adaptativa del huésped [160].

Estas interacciones parecen ser bidireccionales y las bacterias también podrían facilitar el desarrollo de infección viral. Un ejemplo de ello es la interacción entre neumococo y metaneumovirus. Por un lado, modelos animales han demostrado que la infección con metaneumovirus aumenta la susceptibilidad a neumonía secundaria por neumococo y se correlaciona con niveles incrementados de factores proinflamatorios a nivel pulmonar que inducen inflamación y daño tisular en el huésped [163]. Por otro lado, estudios *in vitro* con cultivos de células del epitelio respiratorio han descrito una mayor susceptibilidad a la infección por metaneumovirus si previamente se exponen estas células a la bacteria *S. pneumoniae* [164]. Además, se ha reportado que las vacunas neumocócicas conjugadas podrían proteger indirectamente frente a neumonías virales, un descubrimiento que aporta más evidencias sobre el papel de *S. pneumoniae* en la infección viral [165]. Esta dualidad evidencia la falta de datos que nos ayuden a comprender el rol de los virus en las dinámicas de colonización del tracto respiratorio superior y la infección respiratoria.

Se debe contemplar el hecho de que las interacciones entre virus y bacterias no se producen de forma aislada, sino en un nicho ecológico diverso con una compleja e intrincada red de interacciones, tanto directas como indirectas, que ponen de manifiesto la necesidad de estudios que evalúen la relación de la infección viral con la microbiota bacteriana en su conjunto. Además, durante los últimos veinte años, y gracias a la secuenciación de nueva generación y a la PCR cuantitativa, se ha detectado la presencia de virus

respiratorios humanos considerados clásicamente patógenos en muestras respiratorias de niños asintomáticos con elevada frecuencia [166, 167], así como también se han descubierto una gran variedad de nuevos virus inocuos y un elevado número de fagos que sugieren la existencia de un viroma diverso y complejo [168]. Este hecho dificulta, aún más, el estudio y la comprensión de las interacciones víricas-bacterianas en la colonización y desarrollo de enfermedad respiratoria.

### 1.2.2 Microbiota del tracto respiratorio superior e infección respiratoria aguda

Las infecciones del tracto respiratorio superior como otitis, sinusitis o faringitis, entre otras, constituyen una causa muy prevalente de morbilidad a nivel mundial, y especialmente en población pediátrica; a la edad de tres años, más del 60% de niños ya han padecido uno o más episodios de otitis media aguda (OMA) [2]. Según datos globales previos a la pandemia COVID-19, el número de infecciones totales del tracto respiratorio superior ascendió a más de diecisiete billones en el año 2019, con tasas de incidencia de más de 220 000 casos de infección del tracto respiratorio superior/100 000 habitantes. Los niños menores de cinco años son una de las poblaciones más afectadas [169].

Aunque menos prevalentes, las infecciones del tracto respiratorio inferior son graves y suelen presentar una elevada tasa de fatalidad. En el mismo año 2019 se produjeron más de 480 millones de episodios de infección de vías respiratorias inferiores, principalmente bronquiolitis y neumonía, que se tradujeron en una tasa de incidencia global de más de 6 000 casos/100 000 habitantes, comparativamente menor a la infección de vías respiratorias altas. Sin embargo, un total de 2.5 millones de personas murieron como consecuencia de esta infección, que se erigió como la cuarta causa de muerte a nivel mundial [170, 171].

Ambos tipos de infección tienen en común que están causadas, con frecuencia, por bacterias con potencial patogénico como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *M. catarrhalis*. Estas bacterias colonizan asintóticamente el tracto respiratorio superior de niños sanos en equilibrio con el resto de microbiota comensal, pero también son capaces de causar infección respiratoria con diferentes grados de severidad e infecciones sistémicas graves [7, 9, 172]. Es, precisamente, la microbiota comensal del tracto respiratorio superior la que podría ejercer un papel importante en la transición de estos patógenos de estado de portador a causar enfermedad, o todo lo contrario, manteniendo al patógeno bajo control y en equilibrio con el resto de microbiota comensal. En este sentido, se ha observado que los perfiles de microbiota nasal con mayor presencia y abundancia de géneros que contienen especies otopatógenas clásicas, como *Haemophilus*, *Streptococcus* y *Moraxella*, tienen mayor riesgo de OMA [155, 156, 173, 174]. También la presencia de otros géneros como

*Actinomyces*, *Rothia*, *Neisseria* o *Veillonella* en la cavidad nasal aumentaría la susceptibilidad a esta infección. Estas bacterias, aunque no son patógenos clásicamente relacionados con la otitis media, podrían estar involucradas en la vía causal de la enfermedad proveyendo a los patógenos de los requerimientos e interacciones necesarias para sobrecrecer de forma localizada y causar enfermedad [174]. Por lo contrario, una menor abundancia de otopatógenos y mayor abundancia de géneros como *Dolosigranulum*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* o *Sphingomonas* en el tracto respiratorio superior se ha relacionado con un menor riesgo de OMA [155, 156, 174]. Marchisio *et al.* [175] observaron que niños con OMA recurrente tenían menor abundancia de bacterias estreptocócicas alfa-hemolíticas en nasofaringe [175]. Este grupo de bacterias se ha relacionado con la inhibición de la proliferación de otopatógenos [176]. La presencia de bacterias potencialmente beneficiosas en el tracto respiratorio superior podría contribuir, por tanto, a mantener estados equilibrados de la microbiota mediante la inhibición del sobrecrecimiento patogénico o mediante la provisión de resistencia a la colonización por otopatógenos.

Más allá del rol del microbioma del tracto respiratorio superior en la infección localizada en las vías superiores, éste también podría jugar un papel clave facilitando, o bien impidiendo, la replicación y extensión de virus y bacterias potencialmente patógenas desde el tracto respiratorio superior hasta las vías respiratorias inferiores. Uno de los ejemplos más significativos de la importancia del microbioma en el desarrollo de infección en el tracto respiratorio inferior es, quizás, la bronquiolitis, causada principalmente por VRS, pero también por otros virus. En el estudio longitudinal de Teo *et al.* [116] concluyeron que los niños menores de un año con perfiles de microbiota nasofaríngea enriquecidos en los géneros *Streptococcus*, *Moraxella* y *Haemophilus* tenían mayor riesgo de propagación de la infección viral de vías respiratorias altas a vías respiratorias inferiores, presentaban mayor gravedad de los síntomas y mayor riesgo de desarrollar asma en el futuro [116, 177]. Otros estudios también han descrito la detección de *H. influenzae* y el género *Streptococcus* en nasofaringe de niños menores de dos años asociada a mayor gravedad de la infección respiratoria viral y admisión en la unidad de cuidados intensivos (UCI) [178–180], si bien el rol de *Moraxella* no está tan claro [178, 179]. El microbioma del tracto respiratorio superior, por tanto, parece estar relacionado no sólo con la susceptibilidad a la infección respiratoria, sino también con la modulación de la gravedad de esta infección, posiblemente a través de la alteración de la función y el metabolismo celular del huésped, entre otros mecanismos. Así, en el estudio de Stewart *et al.* [181] correlacionaron una mayor abundancia de metabolitos de esfingolípidos (moléculas con funciones de señalización importantes en inflamación y respuesta inmunitaria a las infecciones) asociada a una microbiota nasofaríngea abundante en *S. pneumoniae* y mayor gravedad de la bronquiolitis [181]. También los perfiles de microbiota enriquecidos en

*H. influenzae* y *Streptococcus* se han asociado con una respuesta inflamatoria exagerada y una infección por VRS clínicamente más grave [178].

En niños con neumonía adquirida en la comunidad se han descrito cambios similares. Los niños con neumonía tienen más frecuentemente un perfil de microbiota nasofaríngea dominado por géneros como *Haemophilus*, *Streptococcus* o *Staphylococcus* en comparación con niños sanos [182]. *Actinomyces* y *Prevotella* también se han encontrado con mayor frecuencia en la nasofaringe de niños con neumonía coincidiendo con una reducción de *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Dolosigranulum* o *Helcococcus* [183]. Además, se ha descrito una reducción de los niveles generales de diversidad de la microbiota respiratoria en la neumonía infantil, posiblemente ligada a un sobrecrecimiento patogénico [184–186]. No obstante, también existen estudios que observan patrones distintos de cambio, incluyendo el aumento de la diversidad asociado a episodios neumónicos [158].

### 1.2.3 Microbiota del tracto respiratorio superior y ENI

La colonización del tracto respiratorio superior por parte de neumococo es un paso necesario, aunque no suficiente, para el desarrollo de ENI [1]. Neumococo coloniza un nicho anatómico y fisiológico cohabitado por una gran variedad de bacterias, virus y otros microorganismos. El éxito o el fracaso en la colonización, así como la persistencia de neumococo en nasofaringe, parece estar ligado, en parte, a las interacciones sinérgicas o competitivas que establece neumococo con el resto de microbiota nasofaríngea [162]. Algunas de las interacciones más descritas están en relación con bacterias potencialmente patógenas como *S. aureus*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis*. Entre la colonización de neumococo y *S. aureus* parece existir una correlación negativa, mientras que la colonización con *M. catarrhalis* y *H. influenzae* en nasofaringe incrementaría la co-colonización con *S. pneumoniae* [187]. Otros estudios también han observado interacciones con otras especies estreptocócicas, como el estudio de Santagati *et al.* [188] en el que demostraron que una microbiota comensal rica en *S. mitis* o *Streptococcus salivarius* podría inhibir la colonización por neumococo mediante la producción de bacteriocinas [188].

Las interacciones entre neumococo y otros microorganismos con los que comparte nicho ecológico no sólo influyen en la colonización, sino también en la virulencia de neumococo. La detección de virus respiratorios en el tracto respiratorio superior se ha asociado en algún estudio a mayor tasa de colonización por neumococo, mayor densidad de esta bacteria en el tracto respiratorio superior y progresión de neumococo de estado de portador a causar ENI [160]. Por otro lado, en el estudio de Weimer *et al.* [189], la coinfección de *S. pneumoniae* con *H. influenzae* indujo la formación de biofilm y previno la infección sistémica por neumococo en modelos animales *in vivo*. Probablemente fue la formación de este biofilm

la que impidió la extensión de neumococo a sitios normalmente estériles y mantuvo a esta bacteria potencialmente patógena localizada en el tracto respiratorio superior. Este estudio, por tanto, también destaca la importancia de las interacciones con otras bacterias en la prevención/desarrollo de ENI [189].

Los pocos estudios que existen sobre la microbiota del tracto respiratorio superior y neumonía, aunque sin identificar el agente etiológico, apuntan a que una microbiota respiratoria rica en bacterias comensales podría inhibir la transición de virus y bacterias con potencial patogénico, como *S. pneumoniae*, de estado de portador en nasofaringe a causa de enfermedad invasiva [183]. Finalmente, la interacción con el resto de microbiota también podría modular la gravedad de la ENI; en el estudio de Ndlangisa *et al.* [190], la interacción de dos serotipos de *S. pneumoniae* como causa de ENI, aunque poco frecuente, se asoció con mayor riesgo de muerte en niños menores de cinco años [190].

La literatura previa sugiere que la microbiota del tracto respiratorio superior podría contribuir a explicar la susceptibilidad diferencial a la ENI en combinación con factores propios del patógeno, del huésped y del ambiente, y destaca la necesidad de aplicar un enfoque holístico para comprender la dinámica y ecología de la ENI.

#### **1.2.4 Microbiota del tracto respiratorio superior como marcador diagnóstico**

Entender la diversidad, distribución y función del microbioma humano, así como también los cambios que se producen asociados a diferentes condiciones patológicas, ha permitido identificar biomarcadores microbianos con presencia y/o abundancia diferencial en un gran número de patologías [191]. Además, gracias a los avances recientes en la secuenciación de ácidos nucleicos, actualmente somos capaces de recopilar un elevado número de datos sobre estas comunidades microbianas y, mediante el uso de técnicas de aprendizaje supervisado, podemos identificar patrones de cambio en conjuntos de datos muy complejos asociados a estados de enfermedad que nos permiten hacer predicciones sobre la clasificación de nuevos pacientes, así como también, a veces, sobre el pronóstico de la enfermedad y eficacia de ciertos tratamientos [191, 192].

Algunos de los ejemplos más avanzados de la utilidad del microbioma como marcador diagnóstico incluyen la detección de biomarcadores microbianos en heces a través de metagenómica *shotgun* para el screening de cáncer colorectal en población adulta, con pruebas comerciales que actualmente están en ensayo clínico [193], o pruebas basadas en biomarcadores microbianos para el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal y la predicción de la eficacia al tratamiento [194, 195]. Asimismo, también se está trabajando en

el desarrollo de pruebas diagnósticas en saliva para otro tipo de cánceres como el de cabeza y cuello [196]. Sin embargo, el diagnóstico basado en el microbioma humano entraña aún múltiples retos, ralentizando su aplicación en la práctica clínica [197], y para muchas otras enfermedades, como la infección respiratoria y enfermedades pulmonares, la investigación en este campo aún se encuentra en fases muy iniciales.

### 1.3 Metodologías para el estudio del microbioma humano

El estudio del microbioma humano tiene su origen en la microbiología del siglo XVII. El progreso en este campo de investigación ha sido frecuentemente impulsado por los avances en paralelo de técnicas y equipos para su estudio. El primer gran hito ocurrió con la invención de los primeros microscopios. Robert Hooke y Antoni van Leeuwenhoek fueron los primeros en visualizar al microscopio muestras de diferente índole, incluido muestras humanas, y descubrieron la existencia de microorganismos asociados a éstas [198, 199]. Sin embargo, la importancia de los microorganismos para el ser humano no fue apreciada completamente hasta casi 200 años más tarde.

El interés en los microorganismos se renovó en el siglo XIX cuando Louis Pasteur descubrió que éstos constituían la causa de que el vino y otros productos alimentarios se fermentaran y pudrieran, y demostró así la importancia de los microorganismos en la vida diaria. Louis Pasteur refutó la teoría de la generación espontánea y probó que los microorganismos estaban presentes en el aire, descubrimientos que le llevaron a formular la teoría germinal de las enfermedades infecciosas. Esta teoría proponía que los microorganismos eran la causa de las enfermedades infecciosas en humanos [200]. Robert Koch, un científico contemporáneo, corroboró esta teoría, desarrolló el concepto de patogenicidad y confirmó la importancia de los microorganismos como agentes causantes de enfermedad en humanos que debían ser eliminados [200].

Con los hallazgos de ambos científicos se inició la edad dorada de la microbiología a finales del siglo XIX y principios del siglo XX. Estudiantes de Pasteur, Koch y otros científicos de la época identificaron a un gran número de microorganismos como la causa de una amplia gama de enfermedades en humanos [200]. La aparición del cultivo y de un extenso arsenal de técnicas microbiológicas durante esta época permitió estudiar la diversidad y caracterizar estos microorganismos bioquímicamente [201].

Trabajos importantes a finales del siglo XIX por parte de Martinus W. Beijerinck y Sergei N. Winogradski en la ecología microbiana permitieron demostrar la existencia

de microorganismos en todos los ambientes naturales, muy frecuentemente asociados con organismos superiores o huéspedes sobre los que ejercían funciones beneficiosas. Además sus trabajos revelaron la convivencia de éstos en comunidades microbianas con interacciones complejas entre ellos y con el ambiente. Este descubrimiento resaltó las limitaciones del cultivo en este aspecto, ya que estudiaba los microorganismos como miembros aislados de la comunidad [88, 202].

El descubrimiento del ácido desoxirribonucleico (ADN) [203], la PCR [204] y las primeras tecnologías de secuenciación [205] a finales del siglo XX permitieron investigar las comunidades microbianas independientemente del cultivo. Especialmente, la aparición de la secuenciación masiva y las técnicas ómicas en los últimos veinte años han sido las que han ocasionado la revolución en la caracterización de las comunidades microbianas en diferentes ámbitos de estudio [206, 207], incluido el microbioma humano.

Todos estos avances han ido construyendo y moldeando nuestra perspectiva sobre los microorganismos a lo largo de los siglos. Actualmente tenemos una visión más completa de la diversidad, así como del papel y la función de estos microorganismos, y sabemos que la mayoría de ellos son esenciales en el funcionamiento de los ecosistemas y ejercen funciones beneficiosas para organismos superiores como el ser humano.

### 1.3.1 Técnicas basadas en cultivo

Los primeros estudios de microbiota respiratoria humana se basaban en microscopía y cultivo tradicional. Estos estudios se centraban en el aislamiento e identificación de bacterias del tracto respiratorio superior con un claro papel patógeno, como *S. pneumoniae* o *S. aureus* [55, 208–210]. Otros estudios empleaban enfoques más generalizados con diferentes medios de cultivo y condiciones de crecimiento que permitieron describir la existencia de una microbiota comensal en el tracto respiratorio superior [105, 106, 211]. No ha sido así con las vías respiratorias inferiores, especialmente el pulmón, que tradicionalmente se ha considerado estéril en ausencia de infección, dada la negatividad del cultivo [60]. Probablemente, esta negatividad es fruto de varios errores conceptuales, como el uso de medios de cultivo destinados al aislamiento de bacterias causantes de infección [60] y la falta de conocimiento sobre los requerimientos de crecimiento necesarios de otras bacterias comensales [212], entre otros factores. No ha sido hasta la aparición de las técnicas moleculares, y principalmente la secuenciación masiva, que se ha conocido la gran diversidad bacteriana asociada al tracto respiratorio superior e inferior [102, 107, 213].

### 1.3.2 Técnicas moleculares

A finales de los años sesenta, las técnicas moleculares permitieron una nueva forma de caracterizar las comunidades microbianas utilizando la información codificada en el genoma

de los microorganismos [88]. Los primeros métodos moleculares permitieron clasificar taxonómicamente las bacterias gracias a propiedades del ADN como el contenido en GC (Guanina-Citosina) o la hibridación de ADN-ADN [214]. Posteriormente, la aparición de la PCR en los años ochenta permitió la amplificación de regiones génicas de interés propias de diferentes microorganismos utilizando cebadores específicos [204].

La aparición de la PCR permitió identificar la presencia/ausencia de un microorganismo en una muestra y, posteriormente, incluso cuantificar su concentración mediante el uso de la PCR cuantitativa. En el campo de la microbiología, los primeros ensayos de PCR fueron diseñados para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana [215] y de otros virus causantes de enfermedad en humanos cuyo cultivo es fastidioso [216, 217]. Actualmente existen ensayos de PCR para la detección y cuantificación de un amplio rango de microorganismos que colonizan y/o causan infección en el tracto respiratorio. Aunque el inconveniente de la PCR dirigida a un patógeno concreto es evidente, ya que se basa en una sospecha previa de los microorganismos que pueden estar presentes en la muestra problema.

Tratando de paliar esta limitación, en el año 1988 se describió por primera vez la PCR múltiple, una variante de la PCR tradicional en la que dos o más regiones génicas de interés se amplificaban simultáneamente en la misma reacción utilizando pares de cebadores distintos para cada región [218]. Este avance supuso la posibilidad de detectar múltiples microorganismos en una sola reacción de PCR reduciendo el volumen de muestra inicial, así como el uso de reactivos, el tiempo de preparación y el coste, y aumentando el rendimiento de la técnica, si bien el diseño de la PCR múltiple es más complejo que el de una PCR simple [219]. Así, en la década de los noventa aparecieron los primeros paneles caseros que detectaban diferentes virus respiratorios en paralelo [220]. Posteriormente, se han diseñado y comercializado un gran número de paneles de PCR múltiple que detectan diferentes virus, bacterias y hongos, y cuyo objetivo principal es identificar el agente etiológico causal de distintos cuadros clínicos, como la infección respiratoria aguda [221]. La utilidad de estos paneles es tal que actualmente se encuentran integrados en los laboratorios de microbiología clínica como rutina diagnóstica y son adecuados para aquellos síndromes infecciosos que cursan con una sintomatología inespecífica especialmente en las primeras horas [221, 222]. Con menor frecuencia, diferentes paneles son utilizados para la caracterización de comunidades microbianas asociadas a un determinado nicho, de forma independiente o en combinación con otras técnicas [116, 183, 223, 224].



### 1.3.3 Aproximaciones ómicas para el estudio del microbioma humano

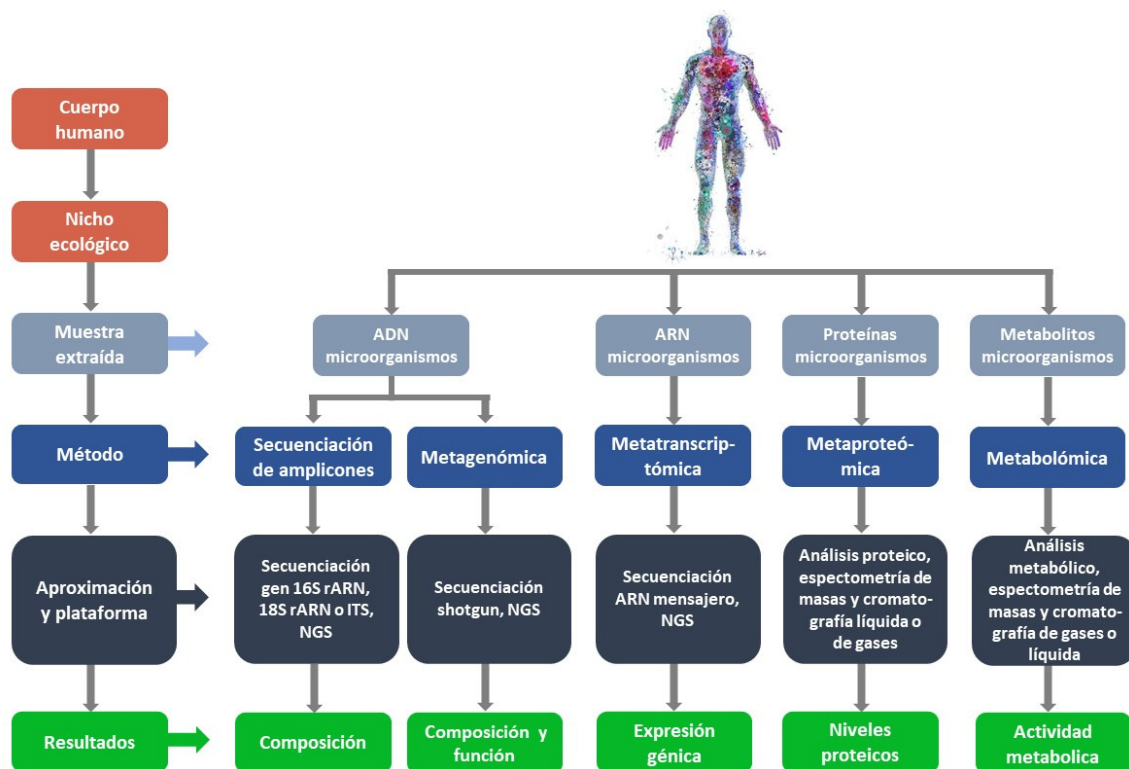
El principal evento que ha revolucionado el campo de la taxonomía procariota y eucariota, y que ha permitido caracterizar con gran precisión las comunidades microbianas humanas, es la aparición de la secuenciación masiva (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*) en la década del 2000. Este avance tecnológico junto con el creciente interés en el microbioma humano provocó el lanzamiento del proyecto del microbioma humano en el año 2008. Este proyecto colaborativo, en el que participaban cuatro centros de secuenciación de renombre, pretendía caracterizar la composición de la microbiota bacteriana y su función en dieciocho zonas corporales (incluyendo zonas del tracto respiratorio superior como la cavidad oral y nasal) de un gran número de individuos sanos e individuos con diferentes condiciones médicas, mediante secuenciación masiva de amplicones del gen ARNr 16S y metagenómica *shotgun* [225].

La secuenciación de amplicones consiste en la extracción de ADN genómico directamente de la muestra clínica, la amplificación de una región genómica conservada en el genoma de los microorganismos (el gen ARNr 16S en procariotas o el gen ARNr 18S en eucariotas) y la posterior secuenciación de los amplicones generados. Estas regiones génicas conservadas poseen, a su vez, regiones hipervariables que permiten la identificación taxonómica y la elaboración de perfiles filogenéticos de las comunidades microbianas estudiadas [226]. Además, indirectamente se puede trazar una idea de la funcionalidad de los microorganismos estudiados comparando las secuencias con genomas de referencia [227]. En la actualidad, la secuenciación de amplicones es el método más empleado para el análisis del microbioma humano, por su rapidez y coste-efectividad, así como por la amplia disponibilidad de herramientas bioinformáticas para su análisis. Sin embargo, también presenta limitaciones, como la dificultad para distinguir especies filogenéticamente cercanas, especialmente si se utilizan regiones hipervariables en vez del gen completo, así como la imposibilidad de ofrecer información directa sobre la funcionalidad de las comunidades microbianas estudiadas, una limitación que hace que cada vez sean más frecuentes los estudios de metagenómica *shotgun* [226–228].

A diferencia de la secuenciación de amplicones, la metagenómica *shotgun* secuencia todo el ADN genómico de toda clase de microorganismos presentes en una muestra. Brevemente, el ADN de todas las células microbianas se extrae, se fragmenta en trozos pequeños y se secuencia [229]. Análisis frecuentemente derivados de este tipo de datos permiten trazar el perfil taxonómico de la comunidad microbiana bajo estudio con resolución a nivel de especie e incluso de cepa. Además, los datos obtenidos permiten extraer información

sobre la potencial funcionalidad del microbioma y su perfil de resistencias, así como también la recuperación de secuencias genómicas completas. Esta técnica, aunque más informativa que la secuenciación de amplicones, también entraña limitaciones; el ADN del huésped tiene que eliminarse previamente, presenta elevada complejidad de análisis bioinformático y coste computacional y no provee información sobre la viabilidad de las comunidades microbianas estudiadas ni sobre la expresión génica [228, 229].

Asimismo, cada vez es más frecuente el estudio del metatranscriptoma en combinación con la secuenciación de amplicones o la metagenómica *shotgun*. La metatranscriptómica captura la expresión génica de las comunidades microbianas analizadas y provee información complementaria sobre la función activa de esta comunidad [228, 230]. Otros métodos permiten estudiar el proteoma y el metaboloma microbiano aportando datos adicionales a diferentes niveles de la fisiología microbiana (Figura 4), si bien las técnicas utilizadas para su estudio son laboriosas, complejas, con elevado coste y/o aún en desarrollo [228].



**Figura 4: Metodologías y aproximaciones para el estudio del microbioma humano.** Los microorganismos que cohabitan un nicho ecológico pueden ser estudiados a diferentes niveles fisiológicos dependiendo del tipo de muestra extraída. La secuenciación de amplicones, la metagenómica, la metatranscriptómica, la metaproteómica y la metabólica son distintas metodologías para el estudio del microbioma humano que abordan el análisis a gran escala de diferentes tipos de muestras utilizando distintas aproximaciones y plataformas. En función de la aproximación y la técnica utilizada se puede obtener información de la composición, función, niveles proteicos, niveles génicos y actividad metabólica de la comunidad microbiana estudiada (Figura adaptada de la revista *Frontiers in pediatrics* [231]).

A pesar de los retos que entrañan las nuevas aproximaciones para el estudio de comunidades microbianas, estas técnicas están ganando reconocimiento durante los últimos años y

demostrando la utilidad de la integración de datos multi-ómicos obtenidos mediante distintos enfoques para el estudio del microbioma humano [232]. Sin embargo, una descripción y análisis en profundidad de estas técnicas, así como de las herramientas bioinformáticas y análisis estadísticos utilizados, quedan fuera del alcance de esta tesis.

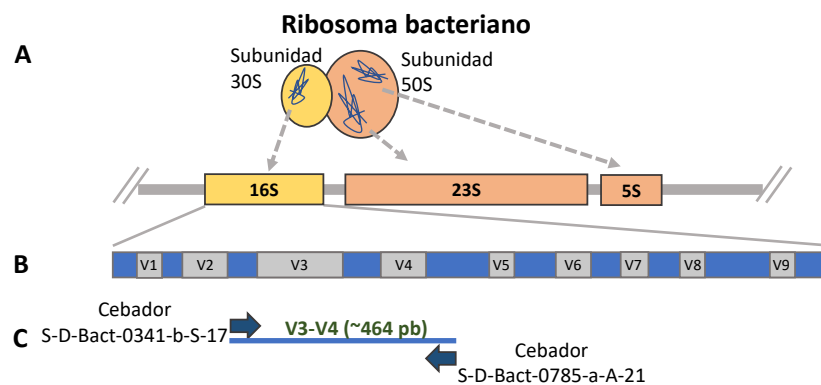
Este trabajo de tesis se centra en el estudio de las comunidades bacterianas que habitan la nasofaringe humana desde el punto de vista de su composición taxonómica a partir de la secuenciación del gen ARNr 16S. A continuación, la introducción se centra en detalle en la importancia de este gen, el gen ARNr 16S, para la elaboración de perfiles taxonómicos, así como en la revisión de las tecnologías empleadas para su secuenciación y los análisis bioinformáticos y de diversidad aplicados en este tipo de datos.

### **1.3.4 Importancia del gen ribosomal ARNr 16S para la caracterización de la microbiota humana**

En 1962, Zuckerkandl y Pauling introdujeron la idea de que los ácidos nucleicos y proteínas son macromoléculas que cambian con el tiempo y que podrían ser consideradas como cronómetros moleculares que reflejan la historia evolutiva de los seres vivos [233]. Más tarde, Woese propuso por primera vez que las secuencias de ARN ribosomal bacteriano podían actuar como marcadores de la evolución de las bacterias y, junto con su equipo, elaboró el primer árbol filogenético basado en secuencias del gen ARNr 16S de diferentes especies de *Bacillus* en los años setenta [234]. Sus estudios indicaron que las variaciones en genes ribosomales constituían un buen reflejo de la evolución del genoma completo de la bacteria y podían ser utilizados como cronómetros moleculares para la taxonomía bacteriana [235]. Desde entonces, el análisis de dos genes que codifican para moléculas del ARN ribosomal, el gen ARNr 16S y el gen ARNr 18S, se han utilizado ampliamente para establecer relaciones filogenéticas en el mundo procariota (bacterias y arqueas) [236] y eucariota [237], respectivamente. Además, el espaciador interno transcrito o espaciador intergénico (ITS, del inglés *Internal Transcribed Spacer*) se utiliza específicamente para hongos [92].

El ARN ribosomal forma parte de los ribosomas, orgánulos citoplasmáticos encargados de la síntesis de proteínas a partir de la información contenida en el ADN y transcrita a ARN mensajero. En el caso de células procariotas, los ribosomas están formados por la subunidad 30S y 50S. La subunidad pequeña 30S la conforman veintiuna proteínas diferentes y la molécula de ARN ribosomal 16S (Figura 5A). Dada su función esencial, el gen ARNr 16S se encuentra de forma ubicua en todas las bacterias con una longitud aproximada de 1542 pares de bases (pb). Este gen alterna en su estructura primaria regiones conservadas y nueve regiones hipervariables (V1-V9) (Figura 5B). Estas últimas presentan variaciones en las secuencias de nucleótidos que son reflejo de los diferentes caminos evolutivos de las

bacterias. De esta forma, el diseño de cebadores de PCR dirigidos a zonas conservadas del gen ARNr 16S permite amplificar todo el gen o algunas regiones hipervariables del gen ARNr 16S de la mayoría de las bacterias presentes en una muestra, a la vez que los cambios en las regiones hipervariables permiten la identificación taxonómica, la comparación y el establecimiento de filogenias [226].



**Figura 5: Esquema del operón ribosómico bacteriano que contiene los genes de ARNr 16S, 23S y 5S.** A) El ribosoma bacteriano está dividido en la subunidad pequeña 30S (conformada por 21 proteínas distintas y el gen ARNr 16S) y la subunidad mayor 50S (conformada por 31 proteínas y los genes ARNr 23S y 5S). Los genes de ARN ribosomal se co-localizan en el mismo operón bacteriano (*rrn*). B) Estructura primaria del gen ARNr 16S constituido por regiones conservadas (azul) y nueve regiones hipervariables (V1-V9, gris). C) Los cebadores S-D-Bact-0341-b-S-17 y S-D-Bact-0785-a-A-21 se unen a las regiones conservadas adyacentes a V3 y V4 y generan amplicones de 464 pb (Figura adaptada de la revista *Journal of UOEH* [226]).

La selección de los cebadores y regiones hipervariables a amplificar se relaciona estrechamente con los resultados, ya que la especificidad de los cebadores no es universal [238, 239]. Tras analizar un elevado número de cebadores distintos en el estudio de Klindworth *et al.* [240], el par de cebadores S-D-Bact-0341-b-S-17 y S-D-Bact-0785-a-A-21 que amplifican la región V3-V4 del gen ARNr 16S de aproximadamente 464 pb obtuvo los mejores resultados (Figura 5C) en términos de cobertura y espectro de filos bacterianos detectados en la base de datos de SILVA [240].

### 1.3.5 Tecnologías para la secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S

En el año 1977, Frederick Sanger desarrolló el primer método para secuenciar el ADN denominado secuenciación Sanger [205]. Se comercializó en el año 1986 y fue la tecnología empleada para secuenciar el gen completo de ARNr 16S y caracterizar la microbiota humana hasta la aparición de tecnologías más avanzadas [241]. Sin embargo, esta técnica suponía

un reto en término de costes y tiempo a la hora de evaluar la diversidad bacteriana de una muestra polimicrobiana [242].

La explosión real de análisis de comunidades microbianas tuvo lugar con la aparición de la secuenciación masiva o de segunda generación en la década del 2000, con la comercialización de una serie de plataformas como GS20 (454 Life Sciences/Roche), Genome Analyzer (Solexa/Illumina), miSeq/HiSeq (Illumina), IonPGM (Ion Torrent/Life Technologies) o SOLiD (Applied Biosystems) [207]. Estas plataformas eran capaces de secuenciar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación, lo que hacía posible la caracterización de comunidades microbianas complejas y elevaba exponencialmente el rendimiento por encima de los sistemas convencionales como Sanger [242]. Además, estas plataformas proporcionaban la posibilidad de incrementar aún más su rendimiento mediante el análisis de diferentes muestras a la vez. Esto se conseguía añadiendo códigos de barra únicos o *barcodes* (secuencias de nucleótidos) a las secuencias de ADN de una misma muestra que permitían identificar la muestra de origen en un proceso denominado multiplexación [243]. Con estas nuevas plataformas, por tanto, se generaban gran cantidad de secuencias por muestra que permitían describir con mayor precisión la diversidad taxonómica de la microbiota humana a un menor coste que con Sanger [242].

La plataforma GS20 lanzada por 454 Life Sciences en el año 2005 y, posteriormente, otras plataformas como GS FLX fueron los primeros equipos de secuenciación masiva disponibles en el mercado que se aplicaron para el estudio de comunidades microbianas complejas, incluidas las asociadas al cuerpo humano [102, 156, 174, 243, 244]. Estos sistemas se basaban en el principio de secuenciación mediante síntesis, en un proceso comúnmente denominado pirosecuenciación [206]. Brevemente, se añadían adaptadores universales (secuencias de oligonucleótidos) a los fragmentos del gen ARNr 16S. Estos fragmentos de ADN de doble cadena se unían a bolitas de sefarosa mediante los adaptadores, que eran complementarios a las secuencias de ADN ancladas en estas bolitas. Una vez unidos, se desnaturalizaban las hebras de los fragmentos del gen ARNr 16S e idealmente quedaba una secuencia del gen ARNr 16S de cadena única por bolita. Entonces, se realizaba una PCR en emulsión que permitía la amplificación de un único fragmento de ADN millones de veces. Tras la PCR estas bolitas contenían millones de fragmentos de ADN idénticos de cadena simple y se distribuían en micropocillos de la placa de secuenciación. En cada ciclo de secuenciación se liberaba un solo tipo de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP, del inglés *Deoxyribonucleotide Triphosphate*). De esta forma, cada vez que la ADN polimerasa incorporaba un nucleótido por complementariedad de bases se liberaba un pirofosfato que era traducido en una señal luminosa y detectado por la plataforma, y se iba construyendo

progresivamente la secuencia nucleotídica de los amplicones analizados. Los últimos modelos de esta tecnología de pirosecuenciación 454 (Roche) permitían generar un tamaño de lectura largo de 700 pb en poco tiempo (10-24h). Sin embargo, esta técnica presentaba diferentes limitaciones, como un bajo rendimiento (0.7Gb) en comparación con otras técnicas disponibles en el mercado, una alta tasa de errores en regiones homopoliméricas y un elevado coste de los reactivos [242, 245]. La aparición de otras técnicas muy competitivas, como las ofrecidas por Illumina, hizo que la compañía que adquirió esta tecnología en 2007, Roche, anunciase su descatalogación en el año 2013 y que finalmente suspendiera el soporte a esta plataforma a mediados del año 2016 [246].

Los sistemas de Illumina/Solexa son los que han tenido una mayor repercusión en la caracterización de comunidades bacterianas en las últimas dos décadas. En la actualidad, las plataformas de secuenciación de Illumina constituyen la tecnología líder en el mercado ya que generan más del 90% de los datos de secuenciación a nivel mundial. Estos sistemas también se basan en el principio de secuenciación mediante síntesis. En este caso, se añaden adaptadores a las secuencias del gen ARNr 16S, pero estos adaptadores fijan los fragmentos de ADN a un soporte sólido, en vez de bolitas, mediante unión complementaria a las secuencias de oligonucleótidos ancladas en esta superficie. Estos fragmentos de ADN son sometidos a una amplificación isotérmica en puente mediante la cual una ADN polimerasa da lugar a grupos de cientos de secuencias idénticas o *clusters* de secuencias separados unos de otros. En la etapa de secuenciación se añaden cíclicamente los dNTPs marcados con fluoróforos diferentes. Los fluoróforos de los dNTPs son liberados cuando se añaden a la secuencia que se está sintetizando por complementariedad de bases, de forma que la longitud de onda y la intensidad de la señal nucleotídica determinan la identidad del nucleótido añadido [247].

Existen diferentes secuenciadores de Illumina con distinto rendimiento y tamaño de las lecturas obtenidas, aunque todos ellos se caracterizan por generar fragmentos cortos de ADN. Las plataformas de secuenciación actuales se caracterizan, además, porque pueden generar lecturas de secuencias desde ambos extremos de la molécula de ADN (lecturas *paired-end*). Como máximo, las plataformas actuales producen secuencias *paired-end* de 300 pb (2x300 pb) [248]. En consecuencia, esta tecnología tan solo es capaz de secuenciar una, dos o tres regiones hipervariables adyacentes del gen ARNr 16S, lo que disminuye la resolución taxonómica de las secuencias [249]. También es una secuenciación lenta en comparación con otras tecnologías y presenta errores de tipo sustituciones nucleotídicas, aunque la precisión de esta tecnología es muy elevada (99.9%) a un precio reducido [242]. Los secuenciadores de Illumina, además, generan gran cantidad de datos (1.2Gb-6000 Gb) y permiten obtener una gran profundidad de secuenciación (número de secuencias/muestra)

[248].

La incorporación más reciente de tecnologías de secuenciación de tercera generación como *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) en 2014/2015 o la secuenciación SMRT (del inglés *Single Molecule, Real-Time*) (Pacific Biosciences) en 2011 pretenden unir las ventajas de la secuenciación Sanger y de segunda generación. Estas tecnologías combinan un elevado rendimiento con la secuenciación de fragmentos de ADN más largos que permiten secuenciar el gen completo de ARNr 16S sin la necesidad del paso de amplificación observado en las tecnologías de segunda generación (como la amplificación en puente o la PCR en emulsión) [207]. Además, esta tecnología es capaz de ofrecer resultados a tiempo real. En el caso de SMRT, su elevado coste y moderado rendimiento, a pesar de disponer de una precisión similar a la ofrecida por Illumina, han hecho que no sea una tecnología muy común en los estudios de ARNr 16S [250]. Por su parte, ONT tiene numerosas ventajas sobre Illumina; facilidad de preparación de librerías, rapidez, portabilidad, posibilidad de realizar análisis a tiempo real, bajo coste y posibilidad de secuenciar el gen completo de ARNr 16S. Sin embargo, la principal desventaja consiste en un elevado número de errores en la lectura de las bases que impide la identificación a nivel de especie e incluso de género [250, 251], aunque las continuas mejoras de la tecnología y *softwares* de lectura la postulan como una herramienta de futuro [252].

### 1.3.6 Análisis bioinformático de los datos de secuenciación del gen ARNr 16S

Las plataformas de secuenciación masiva proveen grandes cantidades de datos; estas plataformas pueden generar millones y billones de secuencias por carrera [242, 248]. Los datos generados mediante secuenciación del gen ARNr 16S proveen información sobre la composición taxonómica de una muestra y permiten trazar perfiles filogenéticos de las comunidades analizadas, aunque para llegar hasta ese punto las secuencias iniciales necesitan ser procesadas utilizando herramientas bioinformáticas.

Las metodologías de análisis bioinformáticos cambian rápidamente. Continuamente aparecen nuevos métodos, algoritmos y herramientas computacionales que tienen una gran repercusión en los resultados finales [253, 254]. Existen una serie de *pipelines* bioinformáticos bien establecidos que se utilizan frecuentemente para analizar los datos de secuenciación de amplicones. La palabra *pipeline* hace referencia a un programa particular o a una secuencia de comandos que combina el uso de muchos *softwares* programáticos diferentes en un cierto orden y con unos parámetros preestablecidos para completar un análisis complejo y facilitar la reproducibilidad de este tipo de estudios. Algunos de los *pipelines* más utilizados son QIIME-UCLUST [255, 256], MOTHUR [257],

USERACH-UPARSE [258], DADA2 [259], QIIME2-Deblur [260, 261] o USEARCH-UNOISE3 [262].

En general, los diferentes *pipelines* constan de una serie de pasos comunes en el análisis de amplicones: 1) preprocesamiento de las secuencias crudas, 2) obtención de la tabla de abundancia de taxones (OTUs/ASVs) y 3) anotación taxonómica de las secuencias consenso.

### 1.3.6.1 Preprocesamiento de las secuencias (*clean-up*)

En esta primera etapa se depuran las lecturas crudas para obtener unas secuencias de buena calidad. Este preprocesamiento frecuentemente incluye la demultiplexación de las secuencias, el recorte de las partes de las lecturas correspondientes a secuencias no biológicas (cebadores, adaptadores y *barcodes*), filtros y recortes de secuencias o trozos de secuencias de baja calidad, así como filtros de longitud mínima y máxima en función del tamaño teórico del amplicón. Si se trata de secuenciación *paired-end*, en la que los amplicones del gen ARNr 16S se secuencian por ambos extremos, las secuencias generadas se superponen y se ensamblan generando un cóntigo del tamaño total del amplicón. Otros pasos frecuentes incluyen la detección y eliminación de secuencias quiméricas. La eliminación de secuencias únicas en todo el conjunto de datos, comúnmente denominadas *singletons* en inglés, así como la eliminación de secuencias de ADN humano fruto de amplificaciones inespecíficas también son pasos descritos en los análisis del gen ARNr 16S [255–264].

### 1.3.6.2 Obtención de la tabla de abundancia de taxones (OTUs/ASVs)

Clásicamente, las secuencias depuradas se agrupan en unidades taxonómicas operativas (OTUs, del inglés *Operational Taxonomic Units*). Las OTUs son grupos de secuencias con elevada similitud que permiten reducir las tasas de errores fruto de la amplificación y/o secuenciación que son interpretados como variación biológica [265, 266]. Una sola secuencia de cada OTU generada es elegida como secuencia representativa o consenso. Algunos *pipelines* basados en esta metodología incluyen QIIME-UCLUST [255, 256], MOTHUR [257] o USERACH-UPARSE [258].

El umbral de similitud canónicamente establecido para las OTUs es del 97%. Tradicionalmente, este umbral agrupa secuencias del gen completo ARNr 16S correspondientes a una misma especie bacteriana, mientras que el umbral del 95% agrupa secuencias sinónimas de género [267, 268]. Estudios más recientes que incorporan un mayor número de secuencias del gen ARNr 16S de diferentes bacterias indican que se necesitaría un umbral de identidad superior al 98% para especie, llegando a ser del 100% si se consideran regiones hipervariables en vez del gen completo [249, 269]. Por lo tanto, la agrupación de secuencias similares en OTUs



conllevaría una pérdida de resolución taxonómica a nivel de especie, desaprovechando la gran calidad de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva que permiten la detección de variaciones a pequeña escala. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la identificación creíble a nivel de especie requiere de estudios fenotípicos, así como de la comparación de los genomas completos utilizando el promedio de nucleótidos idénticos entre los genes compartidos o parámetros de distancia entre genomas [270, 271]. Por tanto, el potencial para sobreestimar o subestimar la diversidad bacteriana es intrínseco a la molécula de ARNr 16S.

En los últimos años se han desarrollado una serie de métodos bioinformáticos basados en la reducción del ruido de secuenciación, llamados algoritmos *denoising*, como alternativa a las OTUs. Estos métodos pretenden mejorar la resolución taxonómica evitando la agrupación de secuencias en OTUs con un umbral de similitud arbitrario. Estos nuevos métodos generalmente tienen dos fases: 1) corrigen errores puntuales en las secuencias aplicando algoritmos y modelos matemáticos complejos que dejan unas secuencias precisas y 2) filtran amplicones quiméricos, finalmente identificando las variantes de secuencia de amplicones verdaderas (ASVs, del inglés *Amplicon Sequence Variants*). Estas ASVs agrupan secuencias únicas e idénticas para los análisis de diversidad que, a diferencia de las OTUs, pueden presentar variaciones a nivel de un solo nucleótido. Algunos de los *pipelines* más comunes que emplean estos métodos son DADA2 [259], QIIME2-Deblur [260, 261] o USEARCH-UNOISE3 [262].

La discusión OTUs vs. ASVs es evidente y se identifican ventajas e inconvenientes asociados a cada tipología de análisis. Por ejemplo, las ASVs parecen tener mayor resolución taxonómica ya que agrupan secuencias exactas que se corresponden con una única bacteria, mientras que las OTUs agrupan secuencias similares que podrían incluir diferentes grupos taxonómicos [272]. No sólo eso, sino que las ASVs también podrían mejorar la reproducibilidad y comparabilidad entre estudios que utilizan el mismo marcador, de forma que pueden ser comparadas directamente [272]. Como inconveniente, las ASVs tienden a sobreestimar la diversidad ya que no tienen en cuenta que la mayoría de genomas bacterianos tienen más de una copia del operón ribosómico *rrn* raramente idénticas entre ellos [273, 274], inconveniente que se resolvería en cierta manera mediante el uso de OTUs.

Más allá de esta discusión, otros autores apuntan a que la elección de *pipeline* bioinformático y la cantidad de biomasa de las muestras analizadas tienen un mayor impacto en los resultados (número de secuencias eliminadas, diversidad alfa, número de OTUs/ASVs espurias) que la aproximación utilizada (OTUs vs. ASVs) [253, 254, 275, 276]. La buena noticia es que, en conjunto, la observación de cambios biológicos y ecológicos reales parece ser robusta a las variaciones en la composición bacteriana asociadas a los distintos métodos

de análisis bioinformáticos, a la cantidad de biomasa de las muestras analizadas y a la presencia de secuencias contaminantes [277–279].

Finalmente, independientemente del uso de OTUs o ASVs, se genera una tabla de abundancia en la que constan el número de secuencias detectadas de cada taxón (OTU/ASV) por muestra, generando así un perfil de microbiota para cada muestra cómo se observa en la Tabla 1. Esta tabla constituye la base para realizar los análisis posteriores de diversidad y marcadores.

**Tabla 1: Tabla de abundancia.** En la tabla se muestran el número de secuencias observadas de cada taxón (filas) para cada muestra (columnas).

Taxón	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
OTU1/ASV1	86633	97902	1441	50	1000
OTU2/ASV2	75000	0	3111	0	302
OTU3/ASV3	5517	13000	0	0	12

### 1.3.6.3 Anotación taxonómica y bases de datos

Las secuencias consenso de ASVs o OTUs se comparan contra una base de datos de referencia y son anotadas en función de la secuencia más cercana identificada en la base de referencia. Clasificadores bayesianos como el clasificador bayesiano simple de RDP [280] o algoritmos de alineamiento como BLAST [281] son comúnmente utilizados para la anotación taxonómica. También Kraken2 [282], RTAX [283], SortMeRNA [284], UCLUST [256] o MOTHUR [257], entre otros, permiten la clasificación taxonómica de las secuencias del gen ARNr 16S. Muchos de estos programas permiten la asignación taxonómica hasta nivel de género, sin embargo con la aparición de nuevos programas como DADA2 [259], UNOISE3 [262] o Deblur [260] se puede llegar hasta nivel de especie. Además, la elección de base de datos no es banal, ya que tiene un gran impacto en los resultados en función de la amplitud y diversidad de secuencias anotadas disponibles [285]. Algunas de las bases de datos más ampliamente utilizadas en los análisis de amplicones de ARNr 16S son Greengenes [286], SILVA [287] y RDP [288].

### 1.3.7 Contaminación en muestras de baja biomasa

En los estudios de microbiota humana pueden surgir problemas de contaminación debido a la introducción de ADN bacteriano exógeno durante el muestreo o procesamiento de muestras (del ambiente, kits de extracción, reactivos de amplificación o secuenciación, etc.), o también por contaminación cruzada con *barcodes*, ADN o amplicones provenientes de otras muestras o carreras de secuenciación [289]. En muestras de baja biomasa, como las muestras respiratorias, la contaminación puede superar y dominar la señal biológica y generarse resultados sesgados que pueden confundir las conclusiones de un estudio

[120, 290]. Se han recomendado algunas medidas para reducir, monitorizar, identificar y mitigar el impacto de la contaminación en este tipo de muestras. Es especialmente relevante el trabajo de laboratorio en condiciones de limpieza y esterilidad, así como la incorporación de diferentes tipos de controles negativos para monitorizar la introducción de contaminantes [289]. La eliminación de taxones previamente descritos como contaminantes [290] o la eliminación de aquellos taxones con mayor prevalencia/abundancia en controles negativos que en muestras biológicas [291], así como el uso de modelos bayesianos que permitan identificar y determinar la proporción de contaminantes en las muestras [292], son otras estrategias empleadas durante el análisis bioinformático para reducir el posible sesgo asociado a contaminantes. En este sentido, reportar los taxones hallados en controles negativos es una práctica cada vez más requerida y fundamental para una interpretación crítica de los resultados.

### **1.3.8 Análisis de diversidad y abundancia diferencial**

Los análisis de diversidad son importantes desde un punto de vista clínico; cambios o diferencias en la composición bacteriana del nicho respiratorio respecto al individuo sano se han asociado con el desarrollo, la gravedad y el pronóstico de múltiples enfermedades [62, 103, 107, 116, 156, 173, 185]. En el año 1972, Whitaker [293] describió tres medidas interrelacionadas con la biodiversidad ampliamente utilizadas en ecología: diversidad alfa, beta y gamma [293]. Las dos primeras constituyen la base de los análisis actuales de microbiota bacteriana para caracterizar la diversidad intra e intermuestras.

Las medidas de diversidad alfa resumen la estructura ecológica de una comunidad en función de su riqueza (número de grupos taxonómicos diferentes), homogeneidad (distribución de los grupos taxonómicos) o ambas [293]. De este modo, una muestra es más rica que otra si contiene mayor número de bacterias. Asimismo, entre dos muestras que presentan el mismo número de bacterias, la muestra más diversa presenta una distribución más homogénea de todas las bacterias. Diferentes índices tratan de estimar la diversidad alfa; algunos, como el número de especies observadas o el índice Chao1 [294], se centran en medir la riqueza, otros índices frecuentemente utilizados, como Shannon [295] o Simpson [296], no sólo miden la riqueza, sino también la diversidad. Estos índices se calculan por muestras individualmente, sin embargo, frecuentemente se comparan los índices entre grupos de muestras con el objetivo de identificar cambios en la diversidad alfa asociados a diferentes factores (como la presencia o no de una enfermedad) mediante test estadísticos estándares.

Los análisis de diversidad beta calculan las diferencias en la composición bacteriana entre muestras a través del uso de medidas de disimilitud o distancia. Matrices de disimilitud

frecuentemente utilizadas en estos análisis son Jaccard, Bray-Curtis o Weighted Unifrac. Todas ellas miden lo mismo, el parecido entre muestras, pero incorporando diferente información; el índice de Jaccard tiene en cuenta la presencia/ausencia de taxones [297], la disimilitud de Bray-Curtis considera la presencia/ausencia de taxones además de su abundancia [298] y, finalmente, Weighted Unifrac calcula las distancias empleando información de la presencia/ausencia de taxones, abundancia de taxones y relaciones filogenéticas entre los taxones [299]. Con el objetivo de evaluar si existen diferencias en la composición bacteriana entre grupos de muestras se aplican análisis multivariados como PERMANOVA [300], una prueba no paramétrica que compara las disimilitudes dentro de un mismo grupo de muestras (intragrupo) en relación con las disimilitudes entre los diferentes grupos de muestras (intergrupo). La significación se establece a través de permutaciones. Otras pruebas frecuentes incluyen ANOSIM [301] y test de Mantel [302].

Los investigadores también pueden interesarse por la identificación de bacterias con abundancia significativamente distinta entre dos grupos o categorías de muestras. Para estas comparaciones se utilizan test estadísticos clásicos no paramétricos con ajuste del *P*-valor para contrastes múltiples, aunque cada vez se recomienda más el uso de métodos específicamente diseñados que tienen en cuenta la naturaleza composicional de los datos de secuenciación del gen ARNr 16S como DESeq2 [303], edgeR [304], SongBird [305], ANCOM-BC [306] o ALDEx2 [307].

Es de destacar que los datos obtenidos a partir de la secuenciación del gen ARNr 16S entrañan diferentes retos para la correcta interpretación de los resultados: 1) las muestras tienen diferencias en la profundidad de secuenciación que reflejan diferencias en la eficiencia de secuenciación, más que diferencias biológicas, 2) las tablas de abundancia contienen una gran cantidad de ceros (90%) y esto hace difícil discriminar entre taxones reales muy poco abundantes o aquellos taxones que se han generado por artefactos de secuenciación o diferencias en la profundidad de secuenciación [308], y 3) los datos de secuenciación del gen ARNr 16S no son datos absolutos, sino relativos, por tanto tienen naturaleza composicional y necesitan ser tratados con herramientas que tengan en cuenta esta característica [308, 309]. La normalización de los datos previo a la ejecución de cualquier análisis de diversidad permite reducir o eliminar los posibles sesgos detectados en las muestras originales y posibilita que éstas puedan ser comparadas. No existe un método consensuado para la normalización de los datos, sino que existen un gran número de ellos con diferentes ventajas e inconvenientes y diferente aplicabilidad en función de las características específicas de cada conjunto de datos. Algunos de ellos incluyen la rarefacción, la aplicación de diferentes factores de normalización o transformaciones logarítmicas [310].

## **2. Justificación e Hipótesis**



## 2.1 Justificación

Como se ha desarrollado a lo largo de la introducción, la información sobre el papel de la microbiota del tracto respiratorio superior en la ENI es escasa y reducida, en gran parte, a la relación de *S. pneumoniae* con virus respiratorios humanos y con otras bacterias potencialmente patógenas con las que comparte nicho ecológico, como *H. influenzae*, *M. catarrhalis* o *S. aureus*. Esto se debe, principalmente, a la utilización de técnicas clásicas de cultivo y técnicas moleculares destinadas a la identificación de patógenos concretos. Con la aparición de la secuenciación masiva, específicamente la secuenciación del gen ARNr 16S, se han publicado algunos artículos que sugieren que la microbiota del tracto respiratorio superior podría tener un papel importante en la susceptibilidad, gravedad, diagnóstico y prevención de la infección en el tracto respiratorio, causada por virus o por patobiontes de la nasofaringe como *S. pneumoniae*. Sin embargo, estos estudios son preliminares y algunos de ellos basados en clasificaciones de los pacientes meramente clínicas o radiológicas, que pueden contribuir a la elevada variabilidad, ya de por sí intrínseca, de la microbiota humana. No existen estudios de secuenciación masiva en individuos con ENI confirmados microbiológicamente que permitan corroborar o rechazar una relación más amplia de la microbiota del tracto respiratorio superior, así como de los factores que la modulan como la vacunación o la lactancia materna, en la transición de *S. pneumoniae* de estado de portador a causar neumonía o infección sistémica.

En los estudios que conforman esta tesis se utilizaron técnicas de secuenciación masiva, específicamente la secuenciación del gen ARNr 16S, dada la escasez de estudios que empleasen esta tecnología para abordar la relación de la microbiota del tracto respiratorio superior con la ENI. Por otra parte, se incluyeron estudios moleculares específicos para el diagnóstico y caracterización precisa de *S. pneumoniae* y de la coinfección viral (detección y cuantificación de ADN de neumococo, tipado capsular de *S. pneumoniae* y array molecular de dieciséis virus respiratorios).

El primer estudio de esta tesis es un estudio preliminar de tipo caso-control prospectivo en el que se reclutaron niños con ENI confirmados microbiológicamente, independientemente de la exposición previa a antibióticos, y se parearon con niños sanos. Este estudio tenía la finalidad de evaluar la existencia de una microbiota nasofaríngea de riesgo o resistente a la ENI, así como identificar biomarcadores asociados a salud que pudieran ayudar en la prevención de la ENI, una enfermedad que en la actualidad sigue presentando una elevada morbimortalidad en población menor de cinco años a pesar de la existencia de vacunas neumocócicas conjugadas.

Previa y paralelamente a la realización de esta tesis, se publicaron varios estudios en los que se sugería la importancia de los antibióticos en la ecología microbiana del tracto respiratorio superior en niños, con un efecto no sólo contra los patógenos diana contra los que van dirigidos, sino también con efecto sobre otras especies comensales. Por ello, se consideró pertinente realizar un segundo estudio que volviese a comparar la microbiota nasofaríngea de niños con ENI y niños sanos, pero esta vez con una estricta selección de casos con exposición antibiótica previa  $\leq 24$  horas.

Este segundo estudio permitiría, además, arrojar más datos sobre la influencia de variables como la vacunación, la lactancia materna y la infección viral en la composición de microbiota nasofaríngea. Se añadió una cohorte control de participantes con infección viral banal de las vías respiratorias superiores con el objetivo de dilucidar el papel de la microbiota del tracto respiratorio superior en la gravedad de la infección respiratoria; desde una infección viral irrelevante a una enfermedad potencialmente grave como la ENI. La necesidad de mejorar el diagnóstico microbiológico de la ENI utilizando muestras no invasivas y la importancia de la microbiota en otros problemas de clasificación en la literatura planteó, también, la posibilidad de que la microbiota nasofaríngea pudiera tener un valor en el diagnóstico diferencial de la ENI, incorporando como objetivo evaluar la utilidad de ésta.

Finalmente, y dado que no existen datos sobre el efecto de los antibióticos en la nasofaringe de niños con ENI en términos ecológicos, en el tercer estudio de esta tesis se investigaron las diferencias en la composición de microbiota nasofaríngea en niños con ENI con diferente grado de exposición antibiótica.



## 2.2 Hipótesis

**Hipótesis 1:** Los niños con ENI tienen una composición de microbiota nasofaríngea distinta a la de niños con infección respiratoria viral banal y niños sanos.

**Hipótesis 1.1:** Determinadas bacterias o consorcios de bacterias de la microbiota nasofaríngea infantil se asocian con salud respiratoria y tienen potencial para la prevención de la ENI.

**Hipótesis 1.2:** La composición de microbiota nasofaríngea varía de acuerdo con la gravedad de los síntomas de la infección respiratoria en niños; los niños con infección respiratoria viral banal (estado representativo de infección del tracto respiratorio superior) tienen un perfil de microbiota más parecido al de niños sanos (estado representativo de salud respiratoria) que los niños con ENI (estado representativo de infección del tracto respiratorio inferior e infección sistémica).

**Hipótesis 1.3:** La caracterización de la microbiota en muestra no invasiva de nasofaringe es de utilidad para el diagnóstico de la ENI en población pediátrica.

**Hipótesis 2:** Factores conocidos implicados en la prevención de la ENI, como la lactancia materna o la vacunación neumocócica, se asocian a una composición de microbiota nasofaríngea resistente a la infección.

**Hipótesis 3:** Los niños con ENI tratados con antibiótico presentan cambios profundos en la composición de microbiota nasofaríngea relacionados con un rápido reemplazo del nicho ecológico que dejan vacante las bacterias susceptibles al antibiótico.



### **3. Objetivos**



El objetivo general de esta tesis ha sido profundizar en el conocimiento sobre la composición de microbiota nasofaríngea en población pediátrica; sus factores moduladores y su implicación en la salud infantil, con especial énfasis en el papel que juega esta microbiota en una infección bacteriana grave como es la ENI.

Con esto, se marcaron los siguientes objetivos:

**Objetivo 1:** Describir y comparar la microbiota nasofaríngea de niños con ENI, niños con infección respiratoria viral banal y niños sanos.

**Objetivo 1.1:** Identificar bacterias o consorcios de bacterias que están más presentes en niños sanos que en niños con ENI y son candidatas a incorporarse a formulaciones probióticas.

**Objetivo 1.2:** Evaluar la relación de la microbiota nasofaríngea con la gravedad de la infección respiratoria aguda mediante el análisis de tres cohortes de participantes con diferentes estados de salud respiratoria: niños con ENI (estado representativo de infección en el tracto respiratorio inferior e infección sistémica), niños con infección respiratoria viral banal (estado representativo de infección en el tracto respiratorio superior) y niños sanos (estado representativo de salud respiratoria).

**Objetivo 1.3:** Valorar la utilidad del estudio de la microbiota nasofaríngea para el diagnóstico diferencial de la ENI utilizando técnicas de aprendizaje supervisado o *machine learning*.

**Objetivo 2:** Describir y comparar la composición de microbiota nasofaríngea en niños en función de la duración de la lactancia materna y el estado de vacunación frente a neumococo.

**Objetivo 3:** Describir y comparar la microbiota nasofaríngea de niños hospitalizados con ENI y diferente grado de exposición a antibióticos.



## 4. Resultados





---

Los resultados de los estudios realizados se han publicado en tres artículos que se presentan a continuación. La doctoranda es segunda autora en el primer artículo, y primera autora en el segundo y tercer artículo.

Estos artículos se han publicados en revistas situadas en el primer cuartil de factor de impacto de sus áreas de conocimiento.

- **Primer artículo:** Camelo-Castillo A, **Henares D**, Brotons P, Galiana A, Rodriguez JC, Mira A, Muñoz-Almagro C. Nasopharyngeal microbiota in children with invasive pneumococcal disease: identification of bacteria with potential disease-promoting and protective effects. *Front Microbiol.* 2019 Jan;10:11. doi: 10.3389/fmicb.2019.00011

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Microbiología. Clasificación; 28/136. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 5.640*

- **Segundo artículo:** **Henares D**, Brotons P, de Sevilla MF, Fernandez-Lopez A, Hernandez-Bou S, Perez-Argüello A, Mira A, Muñoz-Almagro C, Cabrera-Rubio R. Differential nasopharyngeal microbiota composition in children according to respiratory health status. *Microb Genom.* 2021 Oct;7(10):000661. doi: 10.1099/mgen.0.000661

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Genética y Herencia. Clasificación; 37/176. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 5.237*

- **Tercer artículo:** **Henares D**, Rocafort M, Brotons P, de Sevilla MF, Mira A, Launes C, Cabrera-Rubio R, Muñoz-Almagro C. Rapid Increase of Oral Bacteria in Nasopharyngeal Microbiota After Antibiotic Treatment in Children With Invasive Pneumococcal Disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Oct;11:744727. doi: 10.3389/fcimb.2021.744727

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Microbiología. Clasificación; 33/136. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 5.293*



## Primer artículo

### **Nasopharyngeal microbiota in children with invasive pneumococcal disease: identification of bacteria with potential disease-promoting and protective effects**

*“Microbiota nasofaríngea en niños con enfermedad neumocócica invasiva: identificación de bacterias protectoras o con potencial para causar enfermedad”*

*Front Microbiol.* 2019 Jan;10:11. doi: 10.3389/fmicb.2019.00011

Camelo-Castillo A, **Henares D**, Brotons P, Galiana A, Rodriguez J, Mira A, Muñoz-Almagro C





# Nasopharyngeal Microbiota in Children With Invasive Pneumococcal Disease: Identification of Bacteria With Potential Disease-Promoting and Protective Effects

OPEN ACCESS

**Edited by:**

Learn-Han Lee,  
Monash University Malaysia, Malaysia

**Reviewed by:**

Emmanuel F. Mongodin,  
University of Maryland, Baltimore,  
United States  
Nuria Salazar,  
Instituto de Productos Lácteos de  
Asturias (IPLA), Spain

**\*Correspondence:**

Alex Mira  
mira\_ale@gva.es  
Carmen Muñoz-Almagro  
cma@sjdhospitalbarcelona.org

† These authors have contributed  
equally to this work and are joint  
senior authors

‡ Membership of the Catalan Study  
group of host-pathogen interaction in  
patients with IPD is provided in the  
Acknowledgments

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Microbial Symbioses,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 03 April 2018

**Accepted:** 07 January 2019

**Published:** 28 January 2019

**Citation:**

Camelo-Castillo A, Henares D,  
Brotos P, Galiana A, Rodriguez JC,  
Mira A and Muñoz-Almagro C (2019)  
Nasopharyngeal Microbiota in  
Children With Invasive Pneumococcal  
Disease: Identification of Bacteria With  
Potential Disease-Promoting and  
Protective Effects.  
Front. Microbiol. 10:11.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.00011

Anny Camelo-Castillo<sup>1</sup>, Desirée Henares<sup>1,2</sup>, Pedro Brotos<sup>1,2</sup>, Antonio Galiana<sup>3</sup>,  
Juan Carlos Rodríguez<sup>3</sup>, Alex Mira<sup>2,4\*†</sup> and  
Carmen Muñoz-Almagro<sup>1,2,5\*†</sup> on behalf of the Catalan Study Group of Host-  
Pathogen Interaction in Patients With IPD<sup>‡</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, <sup>2</sup> Network of Epidemiology and Public Health, CIBERESP, Barcelona, Spain, <sup>3</sup> Department of Microbiology, Hospital de Alicante, Alicante, Spain, <sup>4</sup> Center for Advanced Research in Public Health, FISABIO Foundation, Valencia, Spain, <sup>5</sup> School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

**Background and Aims:** The risk of suffering from some infectious diseases can be related to specific microbiota profiles. Specifically, the nasopharyngeal microbiota could play a role as a risk or protective factor in the development of invasive disease caused by *S. pneumoniae*.

**Methodology:** We analyzed the nasopharyngeal microbiota of children with invasive pneumococcal disease (IPD) and that of healthy controls matched by age, sex, and seasonality from Catalonia, Spain. Epidemiological, microbiological and clinical variables were considered to compare microbiota profiles, analyzed by sequencing the V1–V4 region of the 16S rRNA gene.

**Results:** Twenty-eight children with IPD (median age 43 months) and 28 controls (42.6 months) were included in the study. IPD children presented a significantly higher bacterial diversity and richness ( $p < 0.001$ ). Principal coordinate analysis revealed three different microbiota profiles: microbiota A, dominated by the genus *Dolosigranulum* (44.3%); Microbiota B, mostly represented by *Streptococcus* (36.9%) and *Staphylococcus* (21.3%) and a high diversity of anaerobic genera including *Veillonella*, *Prevotella* and *Porphyromonas*; and Microbiota C, mainly containing *Haemophilus* (52.1%) and *Moraxella* (31.4%). The only explanatory factor for the three microbiotas was the classification of children into disease or healthy controls ( $p = 0.006$ ). A significant negative correlation was found between *Dolosigranulum* vs. *Streptococcus* ( $p = 0.029$ ), suggesting a potential antagonistic effect against pneumococcal pathogens.

**Conclusions:** The higher bacterial diversity and richness in children with IPD could suggest an impaired immune response. This lack of immune competence could be aggravated by breastfeeding <6 months and by the presence of keystone pathogens

such as *Porphyromonas*, a bacterium which has been shown to be able to manipulate the immune response, and that could favor the overgrowth of many proteolytic anaerobic organisms giving rise to a dramatic dysbiosis. From an applied viewpoint, we found suggestive microbiota profiles associated to IPD or asymptomatic colonization that could be used as disease biomarkers or to pave the way for characterizing health-associated inhabitants of the respiratory tract. The identification of beneficial bacteria could be useful to prevent pneumococcal infections by integrating those microorganisms in a probiotic formula. The present study suggests not only respiratory tract samples, but also breast milk, as a potential source of those beneficial bacteria.

**Keywords:** nasopharyngeal microbiota, children, invasive pneumococcal disease, *Streptococcus pneumoniae*, *Dolosigranulum*

## INTRODUCTION

The human microbiota communities and their genes are an intriguing ecosystem that play an essential role for human body functions including food digestion, nutrition, regulation of human metabolism, and regulation of immune defense against infections, among others (Zhu et al., 2010). The majority of microorganisms of the human ecosystem act as symbionts that co-evolve and co-adapt with their human host according to their diet, life-style, human genetic characteristics, immune modulation, or environment parameters (Dethlefsen et al., 2007). Particularly in samples from the respiratory tract, the variability in bacterial composition between individuals has been described to be so high that a core microbiome could not be defined at the species level (Bogaert et al., 2011). Despite this inter-individual variability, the bacterial composition of each person has been proposed to fall within discrete categories where some bacterial taxa dominate the community. The presence of these structured microbial consortia was first described in the gut, where three groups or “enterotypes” were found, dominated by *Bacteroides*, *Prevotella*, or *Ruminococcus* (Arumugam et al., 2011). However, the notion of enterotypes is currently under debate, and it is still not clear whether enterotypes can be generalized to the general population, or whether microbiota follows in fact a gradient in taxonomic composition (Jeffery et al., 2012). In children between 1 and 3 months of age, for instance, the hypopharynx was found to contain four or five community types, and these “pneumotypes” followed specific trajectories during the child’s development (Mortensen et al., 2016). In adults, bronchoalveolar lavage samples showed two distinct pneumotypes, one of which was enriched with oral microorganisms (particularly *Prevotella* and *Veillonella*) and appeared to be associated with higher inflammatory markers (Segal et al., 2013). Thus, studying the bacterial community structures in the respiratory tract could be important to understand susceptibility to Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) or to pulmonary infections like pneumococcal pneumonia or, more extensively, Invasive Pneumococcal Disease (IPD).

It has been proposed that the degree of stability of the microbiota depends partly on the first colonization by keystone

species in the first days of life (Relman, 2012). Natural feed of humans in their early days is breastfeeding, so human milk is expected to be a major supplier of keystone species for human microbiota development, including the respiratory tract, given the high microbial diversity in colostrum, transition, and mature milk (Hunt et al., 2011; Cabrera-Rubio et al., 2012). In addition, breast milk provides macronutrients, micronutrients and bioactive molecules that protect against infections and inflammation and are key factors for human growth and development (Ballard and Morrow, 2013). Another source of resilience to infection is provided by the antagonistic interactions between the local microbiota and the invasive species. For instance, the nasal passage inhabitant *Corynebacterium accolens* appears to be over-represented in children without *Streptococcus pneumoniae* nasal colonization and has been shown to release antipneumococcal free fatty acids from human skin surface triacylglycerols (Bomar et al., 2016). Other commensal bacteria produce antimicrobial peptides that have been shown to inhibit oral pathogens (López-López et al., 2017) and prevent pharynx infections in children (Di Pierro et al., 2014). Thus, understanding microbiota composition and structure in respiratory samples will be instrumental for establishing disease risk and for the development of probiotics that could be used to colonize the respiratory tract and contribute to the prevention of infections (Tagg and Dierksen, 2003; Medina et al., 2008).

Our hypothesis is that the nasopharyngeal microbiota plays a role as a risk or protective factor in the development of invasive disease caused by *S. pneumoniae*. To test this hypothesis, the objective of the present study was to characterize the nasopharyngeal microbiota profiles in two groups of children: (i) children with invasive pneumococcal disease (IPD), considered as a case group whose nasopharyngeal microbiota was suffering an important disturbance; and (ii) a matched control group of healthy children representative of a healthy nasopharyngeal niche. A series of epidemiological, microbiological, and clinical variables related with major risk of developing IPD were considered to compare microbiota profiles in the two groups. For robust characterization of bacterial composition, a long-fragment 16S sequencing approach was used, in which a 780 bp region of the gene was

amplified and sequenced in order to improve taxonomic assignment.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design

This was an observational prospective study including all children and adolescents (<18 years) with IPD admitted to 5 hospitals in Catalonia, Spain: Hospital Sant Joan de Deu, Hospital de Nens, Hospital de Mataro, Hospital de Vic and Hospital de Calella (HC), during the period January 2014 to March 2015. One healthy control that was treated at Sant Joan de Deu hospital for minor surgery (i.e., phimosis or minor dermatologic surgery) was selected for each case. Cases and controls were matched by age, sex, and seasonality, given previous evidence of seasonal influence on the microbiota composition of respiratory samples (Bogaert et al., 2011). Children whose parents or guardians did not sign the informed consent were excluded of the study. The study was performed following the guidelines of the Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Deu which approved the study. All information collected has been treated confidentially and in accordance with applicable laws on personal data.

### IPD Definition

IPD was defined as the presence of clinical findings of infection (which were used for classification of the disease) together with isolation of *Streptococcus pneumoniae* and/or DNA detection of autolysin (*LytA*) gene and an additional capsular gene of *S. pneumoniae* by Real-Time PCR in plasma, cerebrospinal fluid or pleural fluid. Clinical diagnoses were mutually exclusive.

### Data Collection

Relevant clinical, epidemiological, immunological, and microbiological variables were collected for each subject including delivery mode, duration of breastfeeding (mixed or exclusive), fulfillment of breastfeeding world health recommendations (minimum duration of 6 months) exposure to crowding, pneumococcal vaccination status, parents' smoking habits, and previous occurrence of respiratory infections. Among microbiological variables we assessed carriers of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) serotypes, invasiveness potential of nasopharyngeal *S. pneumoniae* serotypes and co-colonization with respiratory viruses. Serotypes were classified according to the studies of Brueggemann et al. (2003), Sleeman et al. (2006), and del Amo et al. (2014). Serotypes 1, 3, 4, 5, 7F, 8, 9A, 9V, 12F, 14, 18C, and 19A were considered to have a high-attack rate or highly-invasive serotypes whereas the remainder were considered as low-attack rate or non-highly-invasive or opportunistic serotypes. In addition, we recorded data of clinical diagnosis, presence of underlying disease, previous antibiotic intake, white blood cell count, C-reactive protein level, occurrence of complications, length of hospitalization, provision of intensive care, and course of disease for the cases.

## Sample Collection and Laboratory Analyses

Nasopharyngeal aspirate samples collected in sterile plastic tubes from cases and controls and eluted with 0.5 ml of phosphate buffered saline (PBS) were extracted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further genomic/microbial analysis. Whenever samples were needed for the sole purposes of the study they were taken by experienced nurses of the Hospital Sant Joan de Deu Clinical Trials Unit.

## Microbiological Methods

### *S. pneumoniae* Detection and Characterization

The definition of Invasive Pneumococcal Disease (IPD) is the presence of clinical findings of infection together with isolation of *Streptococcus pneumoniae* by culture and/or DNA detection of *S. pneumoniae* by Real-Time PCR in plasma, cerebrospinal fluid or any other sterile fluid. The microbiological confirmation of the patients is based on one technique, the other or both together. All pneumococcal isolates were identified by standard microbiological methods, including the optochin sensitivity test and an antigenic test targeting the capsular polysaccharide (Slidex pneumo-kit, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). DNA detection of pneumococcal *LytA* gene was performed by a duplex real-time PCR as previously reported (Selva et al., 2014; del Amo et al., 2015). This duplex real-time PCR also included as target the *Rnase P* human single-copy gene to detect and measure the number of human cells (Brotos et al., 2017), using primers and probes recommended by CDC (Meningitis, 2011). Absolute quantification of RNaseP using PCR can be used to estimate the number of human cells present in the clinical samples. The measure of Human DNA load was then used to normalize by potential differences in sample amount and avoid potential bias between samples. In addition, DNA was measured prior to PCR and concentrations adjusted to minimize amplification bias between samples. Capsular typing was carried out by a molecular technique based on automated fluorescent fragment analysis which allows differentiation of 40 serotypes (Selva et al., 2014). Quellung reaction performed at the National Center for Microbiology (Majadahonda, Madrid) was used to complete serotyping in invasive strains isolated by culture.

### Viral Respiratory Study in Nasopharyngeal Samples

All nasopharyngeal samples were tested by Anyplex™ II RV16 Detection v1.1. (Seegene, Seoul, Korea). This multiplex Real-Time PCR assay performs simultaneous amplification, detection and differentiation of DNA/RNA of Adenovirus (AdV), Influenza A virus (FluA), Influenza B virus (FluB), Parainfluenza virus 1 (PIV1), Parainfluenza virus 2 (PIV2), Parainfluenza virus 3 (PIV3), Parainfluenza virus 4 (PIV4) Rhinovirus A/B/C (HRV), Respiratory syncytial virus A (RSV A), Respiratory syncytial virus B (RSV B), Bocavirus 1/2/3/4 (HBoV), Metapneumovirus (MPV), Coronavirus 229E (CoV 229E), Coronavirus NL63 (CoV NL63), Coronavirus OC43 (CoV OC43), Enterovirus (HEV), and an internal control in two PCR sets.

## Microbiota Analysis

DNA extraction of nasopharyngeal aspirates was performed by Nuclisens® EasyMag® according to manufacturer instructions (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). This is an automated system for total nucleic acid extraction based in magnetic silica particles. After extracting the DNA, its quality and quantity was measured with Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and only samples with a 260/280 absorbance ratio between 1.8 and 2 were processed for Next Generation Sequencing (NGS).

NGS libraries were created with 100 ng of total DNA for each sample, to which a unique multiplex identifier (MID) was assigned. PCR amplification of the 16S rRNA gene was performed using high fidelity Extensor Long Range PCR Enzyme (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), with the degenerate universal bacterial primers of 16S rRNA gene 8F (5'-CAGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 785R (5'-GGCCVGGGTATCTAATCC-3') (Simón-Soro et al., 2014) and the following cycling conditions to minimize amplification biases (Simón-Soro et al., 2014): 2 min at 94°C, followed by 30 cycles of 10s at 94°C, 30s at 52°C, 90s at 68°C, and a final step of 7 min at 68°C. These primers amplified the variable regions 1 to 4 (V1–V4) of 16S rRNA gene with an expected size of 780 pb. The PCR products were first purified using a Minielute PCR purification Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and then using Agencourt AMPure beads (Beckman coulter, Munich, Germany). Finally, the amplicons were pyrosequenced using a 454 GS FLX Titanium chemistry (Roche, Basel, Switzerland) with Lib-L type microspheres, pooling 20 samples per 1/8 of a pyrosequencing plate.

Negative controls (PBS) were extracted by the same method of the studied samples (Easymag) and 16S rRNA gene and Human *Rnase P* gene were analyzed by PCR, producing no amplification. DNA concentrations for negative controls were also below the quality control thresholds required at MacroGen Inc. (Republic of South Korea). In addition, a negative control (water) was included in each sequencing run to discard contamination during library preparation, producing no results.

## Bioinformatic Analysis and OTU Assignment

Raw sequences were analyzed using “Quantitative Insights into Microbial Ecology” (QIIME) v1.7.0 software (Caporaso et al., 2010) and were separated using the 8-bp “barcodes” assigned to each sample. Chimeric sequences were eliminated by ChimeraSlayer program (Haas et al., 2011). An end-trimming quality filtering was performed by removing 50-bp windows with quality values <25 using Prinseq. Only reads >500 bp were included for taxonomic classification. Sequences with differences in the primer binding region or with more than four ambiguities in homopolymeric regions were excluded from the analysis. The resulting high quality sequences of the 16S rRNA gene were classified using the RDP database (Ribosomal Database Project) (Cole et al., 2009) with a bootstrap cutoff of 80%. Samples were classified in Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% sequence identity as the standard species-level boundary

(Yarza et al., 2008). Only the OTUs representing over 0.1% of the total sequences of each sample were considered for further statistical analysis, as low-frequency reads, including singletons, are more likely to represent sequencing errors, contaminants, or transient organisms without a biological role at the niche under study (de la Cuesta-Zuluaga and Escobar, 2016). Bacterial taxonomic composition was determined for each sample and means for each group (cases and controls) were calculated.

## Estimation of Microbial Diversity and Statistical Analysis

Data analysis was performed using QIIME 1.7.0 software. Rarefaction curves (Mean ± S.E.) were calculated by including 1,000 randomly selected reads per sample. Alpha diversity indexes were calculated from rarefied samples (1,000 sequences per sample), using the Shannon index (Shannon, 1948) for diversity and the Chao1 index (Chao, 1984) for richness. Beta diversity was also calculated with the rarefied 1,000 reads per sample using weighted and unweighted UniFrac (Lozupone et al., 2006) distance matrices, and the principal coordinate analysis (PCoA) generated 2D and 3D plots for all mapping fields. In addition, we clustered samples using UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, also known as average linkage) (Michener and Sokal, 1957). Two-way comparisons in bacterial composition using the UniFrac metric (Lozupone et al., 2006) were used to measure whether the microbial communities in the microbiota types were significantly different. A tree with 1,000 reads from each sample was obtained, and microbiota types were considered significantly different if the UniFrac distance value for the tree was larger than expected if the sequences were randomly distributed. A thousand permutations were performed to obtain a *P*-value, using Bonferroni corrections for multiple comparisons. In addition, we also performed Constrained Correspondence Analysis (CCA), which is a statistic tool which emphasizes variation, and tests whether the factor provided (the microbiota type) can explain part of the total variability. This analysis was performed by the R software ade4 package (Dray and Dufour, 2007) using the Chi-squared distances-based function CCA. Adonis tests were done with the R library “vegan” (Oksanen et al., 2018) to determine corrected *p*-values.

Microbial community comparisons and statistical analysis were performed using the statistical software R v2.15.2 with the packages for Community Ecology (vegan), Euclidean Methods in Environmental Sciences (ade4), The Bee Swarm Plot (beeswarm) and gplots packages (<http://R-project.org>), R (The R Foundation for Statistical Computing).

We used LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) with default parameters (Segata et al., 2011), available in the Galaxy Web Server toolkit to determine significant differences (alpha value = 0.05) in the proportions of bacterial genera between cases and controls groups. LEfSe uses the non-parametric factorial Kruskal-Wallis (KW) sum-rank test to detect features with significant differential abundance with respect to the class of interest.



Normality of the data was analyzed with the Shapiro-Wilk test. Continuous data with normal distributions were described using mean and Standard Deviation (SD). In case of non-normal distribution, median and interquartile range (IQR) were used. Significance (*p*-values) of continuous and normally distributed data was determined using Student's *t*-test. When data did not follow a normal distribution, Wilcoxon signed-rank test was used. Significance of categorical data was established by using Chi-square test. When Chi-square expected frequency was equal or less than five, Fisher's exact test was applied. When variables followed a normal distribution, the ANOVA test was used to determine if there were statistically significant differences in mean values between the microbiota groups. If distribution

was not normal, we used the non-parametric Kruskal-Wallis test. Multiple testing correction was performed when needed.

## Ethics Statement

The study was performed following the guidelines of the Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Deu which approved the study (project approval code PIC-70-15). All information collected has been treated confidentially and in accordance with applicable laws on personal data. Written consent was obtained from parent or legal guardians of children included in the study.

**TABLE 1** | Epidemiological and microbiological characteristics of study groups.

Variable	Cases (n = 28)	Controls (n = 28)	<i>p</i> -value
<b>EPIDEMIOLOGICAL VARIABLES</b>			
Age, months (Md, IQR)	43.0 (20.8–60.2)	42.6 (31.6–58.9)	0.72
Gender, male	16 (57.1)	16 (57.1)	1.00
Influenza season	12 (42.9)	14 (50.0)	0.59
Race, Caucasian	23 (82.1)	25 (89.3)	0.71
Birth weight, gr (Mean, SD)	3,143 (626)	3,298 (579)	0.34
Gestational age, weeks (Mean, SD)	38.5 (2.3)	38.8 (2.0)	0.67
Delivery type, C-section <sup>†</sup> (cases: n = 25; controls: n = 26)	7 (28.0)	10 (38.5)	0.43
Breastfeeding	23 (82.1)	19 (67.9)	0.22
Breastfeeding duration ≥6 months <sup>‡</sup> (cases: n = 23; controls: n = 19)	9 (39.1)	13 (68.4)	0.06
Breastfeeding duration, months (Md, IQR) <sup>†</sup> (cases: n = 23; controls: 19)	4 (1–7)	6 (4–10)	0.19
Day-care attendance	25 (89.3)	23 (82.1)	0.45
Shared bedroom <sup>†</sup> (cases: n = 21; controls: 27)	13 (61.9)	12 (44.4)	0.23
Parental smoking <sup>†</sup> (cases: n = 26)	11 (42.3)	13 (46.4)	0.76
Vaccinated against influenza	1 (3.6)	0 (0.0)	1.00
Vaccinated against pneumococcal disease	17 (60.7)	19 (67.9)	0.58
PCV13 vaccinated	14 (82.4)	17 (89.5)	0.42
Respiratory infection in the previous 30 days <sup>†</sup> (Controls: n = 27)	13 (46.4)	13 (48.1)	0.90
<b>MICROBIOLOGICAL VARIABLES</b>			
Sp detection in NP sample by PCR	18 (64.3)	16 (57.1)	0.58
High-attack rate Sp serotype in NP sample	10 (55.5)	2 (12.5)	<b>0.009</b>
PCV13 serotype coverage in NP sample	11 (61.1)	2 (12.5)	<b>0.004</b>
Viral detection in NP sample by PCR	17 (60.7)	14 (50.0)	0.42
Rhinovirus	10 (35.7)	10 (35.7)	1.00
Adenovirus	4 (14.3)	4 (14.3)	1.00
Parainfluenza virus	2 (7.1)	1 (3.6)	1.00
Respiratory syncytial virus	2 (7.1)	0 (0.0)	0.49
Coronavirus	1 (3.6)	2 (7.1)	1.00
Enterovirus	1 (3.6)	0 (0.0)	1.00
Bocavirus	1 (3.6)	0 (0.0)	1.00
Influenza A virus	2 (7.1)	0 (0.0)	0.49
Influenza B virus	0 (0.0)	1 (3.6)	1.00
Multiple respiratory viral infection	5 (29.4)	4 (28.6)	1.00

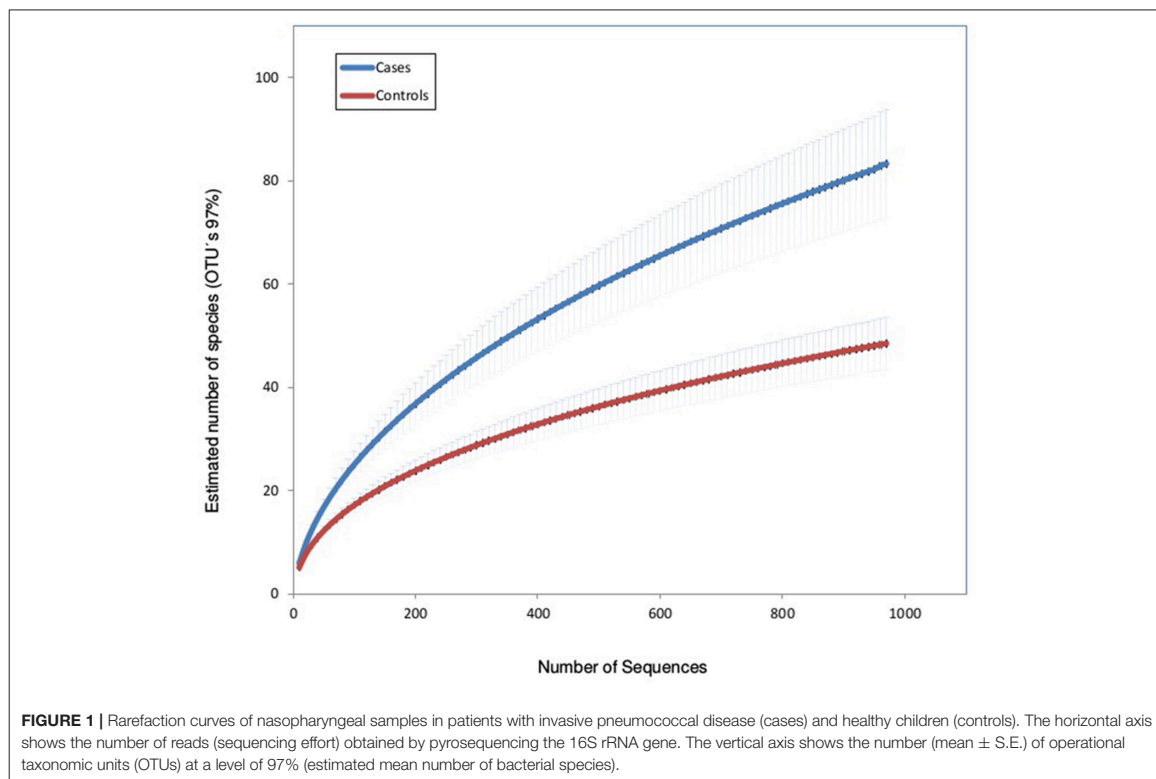
Results expressed as counts (%) unless stated otherwise.

Md, median; IQR, interquartile range; SD, standard deviation; PCV13, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine; PICU, pediatric intensive care unit.

<sup>†</sup>missing values.

<sup>‡</sup>according to WHO recommendations.

The bold values means statistically significant associations with *p*-values < 0.05.



## RESULTS

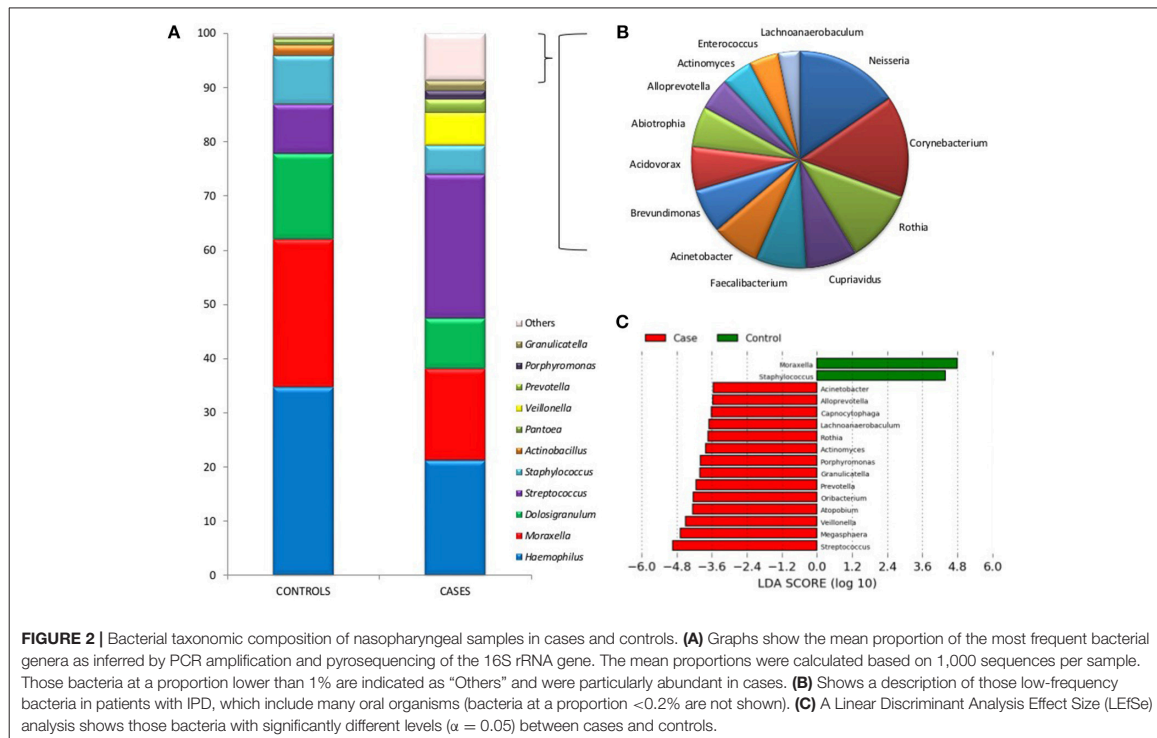
### Epidemiological and Clinical Features of Patients

During the study period a total of 53 patients were diagnosed of IPD in Hospital Sant Joan de Deu ( $n = 38$ ), Hospital de Nens ( $n = 6$ ), Hospital de Mataro ( $n = 5$ ), Hospital de Vic ( $n = 2$ ), and Hospital de Calella ( $n = 2$ ). Fourty-two of them (79.2%) accepted to participate in the study under informed consent. Twenty-eight (52.8%) controls were available for matching with cases so the study finally comprised 56 subjects. No significant differences of total human DNA load was found between samples of cases and controls ( $\text{Log}_{10}$  3.6 vs. 3.2 gene copies/reaction,  $p = 0.1$ ), indicating that both types of samples did not differ in the amount of material.

The median age of the 28 cases was 43.0 months (IQR 20.8–60.2 months) and 16 (57.1%) were male. The clinical diagnoses of these patients were 19 pneumonia (including 10 complicated pneumonia with empyema and 3 necrotizing pneumonia), 7 bacteremia, 1 meningitis, and 1 fulminant sepsis. Invasive samples collected for diagnosing IPD included blood ( $n = 19$ , 67.8%), pleural fluid ( $n = 5$ , 17.9%), blood and pleural fluid ( $n = 3$ , 10.7%), and cerebrospinal fluid ( $n = 1$ , 3.6%). Detection of *S. pneumoniae* in invasive samples was performed by PCR ( $n = 14$ , 50.0%), by culture ( $n = 12$ , 42.9%), and both by PCR and culture ( $n = 2$ , 7.1%). Median white blood

cell count of 17,515/L and median C-reactive protein levels of 154.7 mg/L indicated inflammatory activity. An underlying disease was reported in 3 cases with chronic pulmonary disease, neuroblastoma, and splenic dysfunction, respectively. Median length of hospitalization was 7 days (IQR 4–8 days). Five cases (17.9%) received intensive care, 4 (14.3%) suffered sequelae, and one child died.

Pneumococcal nasopharyngeal carriage was observed in 18 (64.3%) cases and 16 (57.1%) controls. A total of 11 PCV13 serotypes were identified among carriers in the case group, specifically serotype 1 ( $n = 2$ ), serotype 3 ( $n = 3$ ), serotype 14 ( $n = 2$ ), serotype 19A ( $n = 3$ ), and serotype 19F ( $n = 1$ ). In contrast, only 2 PCV13 serotypes, classified as serotype 3, were found in control carriers. Nasopharyngeal samples were taken from cases after a mean of 92 h of fever (IQR 48–408 h) and all of them except two (one patient with necrotizing pneumonia and another one with fatal fulminant sepsis and viral respiratory coinfection), were exposed to beta-lactamic antibiotic treatment, during a mean period of 4 days. No patients were exposed to macrolide treatment or other class of antibiotics. **Table 1** shows epidemiological and microbiological variables for cases and controls. Proportions of coinfection with respiratory virus and pneumococcal nasopharyngeal carriage, were higher in cases compared to controls, but the differences between groups did not reach statistical significance. There was a significantly higher proportion of PCV13 pneumococcal serotype carriers



in cases compared to controls (61.1 vs. 12.5%,  $p = 0.004$ ) as well as significantly higher number of high-attack rate serotypes (55.5 vs. 12.5%,  $p = 0.009$ ). A trend for significance was observed for breastfeeding through 6 months (the minimum time recommended by World Health Organization) in cases (39.1 vs. 68.4%,  $p = 0.06$ ).

### High Bacterial Diversity in IPD Patients

A total of 284,558 16S rRNA sequence reads were obtained. After sequence length and quality filtering, we obtained 201,888 reads > 500 bp (500–780 bp), with an average of 2.549 reads of the 16S rRNA gene per sample (range between 1,085 and 29,370 reads).

Rarefaction curves (using OTUs at 97% sequence identity) showed that mean bacterial richness had higher values in children with IPD compared with healthy patients (Figure 1). Individual rarefaction curves with 1,000 reads show that most bacteria present were detected by this level of coverage and show a shift toward higher OTU richness in children with IPD (Supplementary Figure 1). Species richness (Chao1 Index) was significantly higher in cases (mean: 79, 95% confidence interval: 57.4–100.58) compared to healthy controls (mean: 47.8, 95% CI: 37.5–58.2,  $p < 0.0001$ ). The Shannon diversity index was also significantly higher in cases (mean: 1.21, 95% CI: 0.94–1.48) vs. healthy controls (mean: 0.77, 95% CI: 0.62–0.92,  $p < 0.0001$ ).

The taxonomic assignment of the 16S rRNA reads revealed that the most common phyla in IPD patients were *Firmicutes* (50.9% of the total number of reads), *Proteobacteria* (41.4%),

*Bacteroidetes* (5.0%), *Actinobacteria* (2.2%), and a lower proportion of *Fusobacteria*. Within the control group, the most common phyla were *Proteobacteria* (66.0% of the total number of reads), *Firmicutes* (33.6%), *Bacteroidetes* (0.2%), and *Actinobacteria* (0.2%).

Figure 2A shows differences between the two groups in the mean proportions of each bacterial genera. In the cases group the most prevalent bacteria were *Streptococcus*, *Moraxella*, *Dolosigranulum*, *Veillonella*, and *Staphylococcus* with 26.4, 21.1, 16.8, 9.3, 6.1, and 5.2% of the total, respectively. Whilst in the control group their proportions were 9.0, 34.5, 27.1, 15.7, 0.1, and 8.9%, respectively. The higher bacterial diversity detected in children with IPD corresponded to the high prevalence of lactate fermenting *Veillonella*, and mainly to genera found at low frequencies. The taxonomic assignment of those genera present at <1% of the total, which accounted for over 9% of the reads in IPD patients, is shown in Figure 2B and reveals the presence of many oral species like *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Actinomyces*, or *Rothia*, among others.

LEfSE ranking analysis shows that *Moraxella* and *Staphylococcus* were found to be significantly more abundant in healthy individuals, according to this high-dimensional class comparison test. On the other hand, the genera *Streptococcus*, *Megasphaera*, *Veillonella*, *Atopobium*, *Oribacterium*, *Prevotella*, *Granulicatella*, *Porphyromonas*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Lachnoanaerobaculum*, *Capnocytophaga*, *Alloprevotella*, and *Acinetobacter* were significantly more abundant in patients

**TABLE 2 |** Bacterial species identified in the present study.

Genus	Species	Cases (n = 28)	Controls (n = 28)
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	51.08%	91.17%
	<i>mitis</i>	23.10%	2.82%
	<i>oralis</i>	7.02%	0.51%
	sp	6.62%	1.07%
	uncultured sp	5.40%	1.49%
	<i>infantis</i>	3.19%	0.13%
	sp. oral clone	1.84%	0.64%
	<i>peroris</i>	0.74%	–
	<i>sanguinis</i>	0.41%	0.77%
	<i>parasanguinis</i>	0.22%	–
	<i>genomosp</i>	0.12%	–
	<i>pseudopneumoniae</i>	0.10%	–
	<i>cristatus</i>	0.07%	0.47%
	<i>pyogenes</i>	0.02%	0.94%
<i>Dolosigranulum</i>	<i>pigrum</i>	83.26%	84.17%
	uncultured sp	16.74%	15.83%
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	80.30%	99.65%
	uncultured sp	11.77%	0.08%
	sp	6.81%	0.03%
	<i>parainfluenzae</i>	1.02%	0.09%
	<i>haemolyticus</i>	0.11%	0.10%
<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>	94.89%	79.71%
	<i>lincolnii</i>	2.93%	8.30%
	<i>nonliquefaciens</i>	2.14%	4.46%
	<i>caprae</i>	0.04%	0.40%
	<i>lacunata</i>	–	7.14%
<i>Prevotella</i>	uncultured sp	34.54%	60.00%
	<i>histicola</i>	15.70%	–
	sp	12.80%	20.00%
	sp. oral clone	12.32%	–
	<i>pallens</i>	9.90%	–
	<i>nanceiensis</i>	3.86%	20.00%
	<i>conceptionensis</i>	3.38%	–
	<i>oris</i>	2.90%	–
	<i>melaninogenic</i>	1.69%	–
	<i>salivae</i>	0.72%	–
	<i>Veillonella</i>	uncultured sp	39.94%
<i>parvula</i>		29.49%	24.00%
sp		14.23%	8.00%
<i>dispar</i>		7.37%	24.00%
sp. oral taxon		6.67%	20.00%
<i>Porphyromonas</i>	<i>tobetsuensis</i>	2.24%	–
	uncultured sp	71.93%	56.25%
	sp. oral clone	14.91%	18.75%
<i>Staphylococcus</i>	sp	13.16%	25.00%
	<i>epidermidis</i>	65.40%	9.67%
	sp	11.16%	47.12%
	<i>haemolyticus</i>	7.07%	0.05%
uncultured sp	6.51%	2.23%	

(Continued)

**TABLE 2 |** Continued

Genus	Species	Cases (n = 28)	Controls (n = 28)
	<i>pettenkoferi</i>	3,35%	–
	<i>devriesei</i>	2,51%	–
	<i>cohnii</i>	1,95%	–
	<i>hominis subsp. null</i>	1,40%	–
	<i>pasteuri</i>	0,28%	–
	<i>warneri</i>	0,28%	–
	<i>aureus</i>	–	40,89%

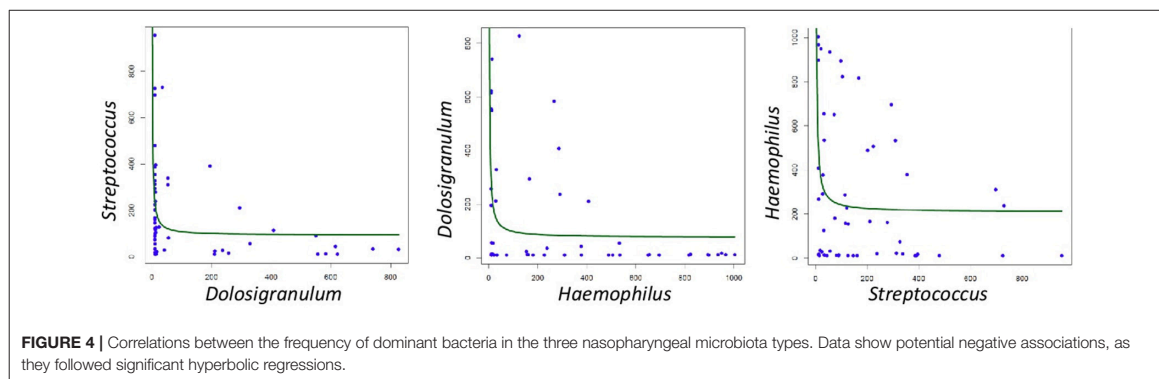
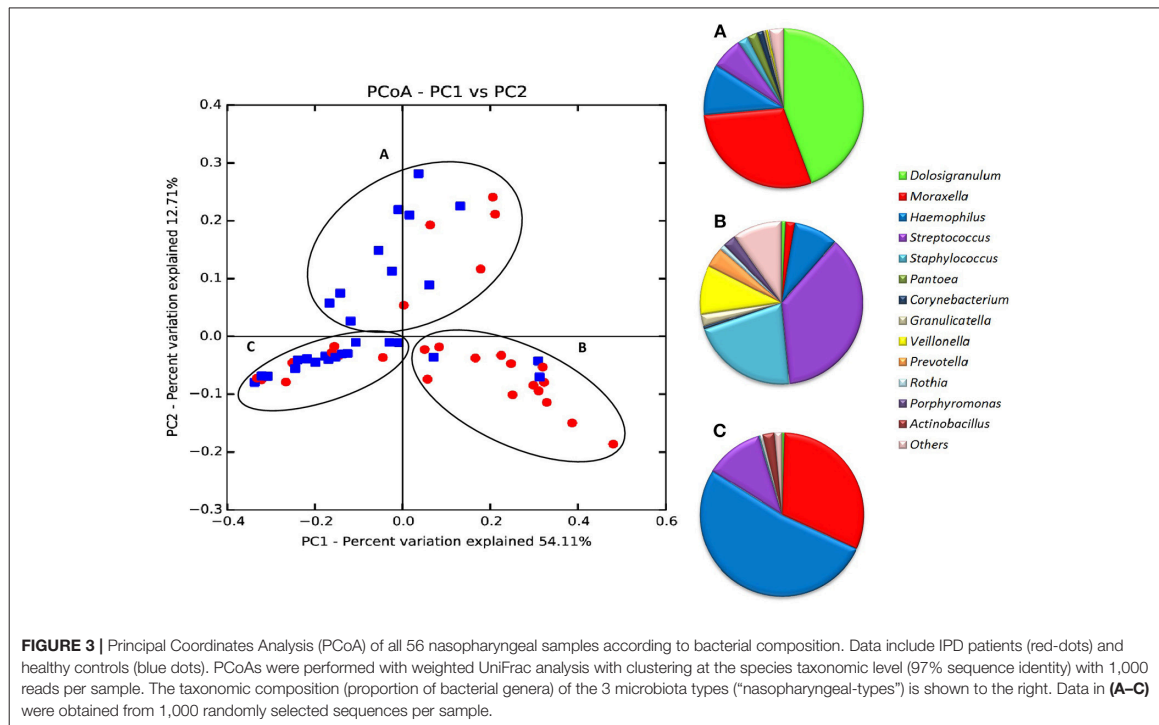
Data indicate percentages of 16S rRNA reads from a given genus with a hit against each species. Frequencies of each genera are shown in **Figure 2**. To minimize taxonomic assignment errors, only hits with >97% nucleotide identity and >500 bp alignment were selected. Only species with frequencies >0.1% are shown.

with IPD (**Figure 2C**). Most of these bacteria are common oral inhabitants (Mira et al., 2017). **Supplementary Figure 2** shows a Heatmap profile showing abundances of bacterial genera in individual cases and controls indicating the age of each child.

The use of long-amplicon (780 bp) sequencing allowed us to taxonomically assign the 16S sequences at the species level with a higher degree of accuracy (Shin et al., 2016). In order to minimize errors in taxonomic assignment, only sequence alignments >97% sequence identity over >500 bp were considered, which would encompass the 16S rRNA hypervariable regions v1–v3/v4. Our results are shown in **Table 2**. According to this assignment, the genus *Staphylococcus* would be dominated by *S. aureus* in the controls (>40% of the reads in this genus) whereas this species would be totally absent in IPD patients, that would be dominated by *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*. Virtually, all *Haemophilus* species in controls would correspond to *H. influenzae*, whereas in the cases, 18% of the reads in this genus would correspond to uncultured or unknown species. It is surprising to note that over 90% of the reads matching *Streptococcus* would correspond to *S. pneumoniae* in the controls while in IPD patients, only 51% of the streptococcal reads would correspond to *S. pneumoniae* and over 40% of them gave top matches to *S. mitis*, *S. oralis*, or uncultured species.

## Microbiota Nasopharyngeal-Types in Health and Disease

When all samples were analyzed by two-dimensional principal coordinates analysis (2D PCoA), 67% of the variability in the data could be explained by the first two components. Samples appeared to cluster in three different groups, corresponding to three different types of respiratory tract microbiota, or nasopharyngeal-types (**Figure 3**). The Microbiota A was mainly composed of reads assigned to the genera *Dolosigranulum* (44.3%), *Moraxella* (29.3%), and *Haemophilus* (10.5%) (**Figure 3A**). The Microbiota B was represented mostly by the genera *Streptococcus* (36.9%), *Staphylococcus* (21.3%), *Veillonella* (9.8%), together with a high diversity of anaerobic genera as *Prevotella* and *Porphyromonas* (**Figure 3B**). Finally, the Microbiota C was composed mainly of the genera *Haemophilus* (52.1%), *Moraxella* (31.4%), and *Streptococcus*



(11.4%) (**Figure 3C**). Thus, nasopharyngeal-type A was dominated by *Dolosigranulum*, nasopharyngeal-type C by *Haemophilus*, and nasopharyngeal-type B by *Streptococcus*, with a high presence of oral microorganisms. The three microbiota types were found to be significantly different from each other (Unifrac Distance, corrected  $p < 0.01$  in all cases). In addition, CCA analysis showed that microbiota type significantly explained the variability in bacterial composition among samples (Adonis  $p$ -value: 0.002). In agreement with the existence of specific bacterial communities dominated by a given genus, negative correlations were found (**Figure 4**)

between the three dominant genera ( $p$ -values for significant hyperbolic regressions were, respectively, 0.029, 0.011, and 0.029 for comparisons between *Dolosigranulum* and *Streptococcus*, *Dolosigranulum* and *Haemophilus*, and *Streptococcus* and *Haemophilus*).

In order to understand the features influencing nasopharyngeal-types, all available epidemiological, microbiological, immunological and clinical variables were compared by bivariate analysis with the three microbiota types. No significant differences were found in any of the variables considered that could explain the grouping in the three different

**TABLE 3 |** Epidemiological, microbiological, immunological, and clinical characteristics by microbiota type.

<b>A</b>				
<b>Variable</b>	<b>Microbiota A (n = 15)</b>	<b>Microbiota B (n = 17)</b>	<b>Microbiota C (n = 24)</b>	<b>p-value</b>
Case group	5 (17.9)	14 (50.0)	9 (32.1)	<b>0.006</b>
<b>EPIDEMIOLOGICAL VARIABLES</b>				
Age, months (Md, IQR)	40.8 (20.8–80.3)	41.4 (32.1–56.6)	44.4 (29.5–61.4)	0.95
Gender, male	8 (53.3)	8 (47.1)	16 (66.7)	0.43
Influenza season	6 (40.0)	6 (35.3)	14 (58.3)	0.29
Race, Caucasian	11 (73.3)	16 (94.1)	21 (87.5)	0.26
Birth weight, gr (Mean, SD)	3,147 (689)	3,329 (749)	3,198 (428)	0.68
Gestational age, weeks (Mean, SD)	38.1 (2.3)	38.6 (2.6)	39.7 (1.7)	0.43
Delivery type, C-section <sup>†</sup> (n = 48)	6 (42.9)	4 (28.6)	7 (30.4)	0.75
Breastfeeding	13 (86.7)	13 (76.5)	16 (66.7)	0.43
Breastfeeding in controls	9 (90.0)	1 (33.3)	9 (60.0)	0.10
Breastfeeding duration ≥ 6 months <sup>¶</sup> † (A: n = 13, B: n = 13, C: n = 16)	7 (53.9)	7 (53.9)	8 (50.0)	0.97
Breastfeeding duration, months (Md, IQR) <sup>†</sup> (A: n = 13, B: n = 13, C: n = 16)	6 (3–10)	6 (3–12)	5.5 (1.5–7)	0.67
Day-care attendance	13 (86.7)	19 (94.1)	19 (79.2)	0.40
Shared bedroom <sup>†</sup> (B: n = 12, C: n = 21)	5 (33.3)	7 (58.3)	13 (61.9)	0.21
Parental smoking <sup>†</sup> (B: n = 15)	8 (53.3)	6 (40.0)	10 (41.7)	0.71
Vaccinated against influenza	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.2)	1.00
Vaccinated against pneumococcal disease	9 (60.0)	13 (46.5)	14 (58.3)	0.45
PCV13 vaccinated	7 (77.8)	11 (84.6)	13 (92.9)	0.61
Respiratory infection in the previous 30 days <sup>†</sup> (n = 52)	6 (42.9)	5 (31.3)	15 (68.2)	0.07*
<b>MICROBIOLOGICAL VARIABLES</b>				
Sp detection in NP sample by PCR	7 (46.6)	9 (52.9)	18 (75.0)	0.16
High-attack rate Sp serotype in NP sample	3 (42.9)	3 (33.3)	6 (33.3)	0.90
PCV13 serotype coverage in NP sample	3 (42.9)	4 (44.4)	6 (33.3)	0.81
Viral detection in NP sample by PCR	7 (46.7)	8 (47.1)	16 (66.7)	0.34
Multiple respiratory viral infection	2 (28.6)	3 (37.5)	4 (25.0)	0.82
<b>IMMUNOLOGICAL VARIABLES (CASE GROUP)</b>				
White blood count, 10 <sup>3</sup> cells/mm <sup>3</sup> † (n = 21) (Md, IQR)	24.6 (18.9–33.4)	15.7 (10.0–18.2)	18.2 (7.5–22.7)	0.12
C-reactive protein, mg/L <sup>†</sup> (n = 20) (Md, IQR)	29.2 (10.8–69.0)	113.1 (50.5–237.6)	302.9 (261.5–355.8)	<b>0.009**</b>
<b>B</b>				
<b>Variable</b>	<b>Microbiota A (n = 5)</b>	<b>Microbiota B (n = 14)</b>	<b>Microbiota C (n = 9)</b>	<b>p-value</b>
<b>CLINICAL VARIABLES (CASE GROUP)</b>				
Underlying disease	1 (20.0)	1 (7.1)	1 (11.1)	0.75
Antibiotic intake in the previous 7 days <sup>†</sup> (n = 26)	5 (100.0)	12 (85.7)	6 (66.7)	1.00
Length of hospital stay, days (Md, IQR)	4 (3–6)	7 (7–8)	7.5 (3.5–10)	0.21
Admission to PICU	0 (0.0)	4 (28.6)	1 (11.1)	<b>0.53</b>
Length of PICU stay, days (Md, IQR)	0 (0.0)	2 (0–6)	1 (1–1)	0.45
Complications	0 (0.0)	2 (14.3)	2 (22.2)	0.80
<b>MAIN CLINICAL DIAGNOSIS</b>				
Complicated pneumonia	0 (0.0)	8 (57.1)	5 (55.6)	0.09
Bacteremia	3 (60.0)	3 (21.4)	1 (11.1)	0.17
Pneumonia	2 (40.0)	2 (14.3)	2 (22.2)	0.51
Meningitis	0 (0.0)	1 (7.1)	0 (0.0)	1.00
Sepsis	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.1)	0.50
Serious IPD (complicated pneumonia, meningitis, or sepsis)	0 (0.0)	9 (64.9)	6 (66.7)	<b>0.04</b>
Course of disease, sequelae or exitus	0 (0.0)	3 (21.4)	2 (22.2)	0.67

Results expressed as counts (%), unless stated otherwise.

Md, median; IQR, Interquartile range; SD, standard deviation; NP, nasopharyngeal; PCV13, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine; PICU, Pediatric Intensive Care Unit; IPD, Invasive Pneumococcal Disease.

<sup>†</sup>Missing values.

<sup>¶</sup>According to WHO recommendations.

\*p = 0.05 comparing Microbiota B and C.

\*\*p = 0.03 comparing Microbiota A and C; p = 0.04 comparing Microbiota A and B. The bold values means statistically significant associations with p-values < 0.05.

microbiotas (Table 3). However, the classification of patients into case and control groups was significantly associated with the nasopharyngeal-types ( $p = 0.006$ , Chi-square test). Among cases, nasopharyngeal-type B was the most frequently detected pattern (50.0%), followed by nasopharyngeal-type C (32.1%), while nasopharyngeal-type A was detected only in 17.9% of children with IPD. Conversely, nasopharyngeal-type B was only detected in 3 controls (10.7%).

Overall, children with nasopharyngeal-type A showed to have markedly lower inflammatory activity measured by the C-reactive protein level when compared to those with nasopharyngeal-type C ( $p = 0.03$ ) or nasopharyngeal-type B ( $p = 0.04$ ). In addition, no case with nasopharyngeal-type A was diagnosed with complicated pneumonia, meningitis, and sepsis, in contrast to the relatively high occurrence of these serious IPD manifestations among nasopharyngeal-type B and nasopharyngeal-type C cases (0.0, 64.9, and 66.7%, respectively,  $p = 0.04$ ). Similarly, none of the cases with nasopharyngeal-type A required intensive care but a noticeable proportion of cases with nasopharyngeal-type B and C did (0.0, 28.6, and 11.1%, respectively). Of note, 90% of the ten healthy controls with a Microbiota A were fed with maternal milk whereas breastfeeding was less frequent in controls with Microbiota B (33.3%) and C-types (60.0%). In spite of these differences, the association between breastfeeding and type of microbiota was not found to be statistically significant. On the other hand, there were no significant correlations between any specific bacterial genera over-represented in IPD patients and inflammatory parameters.

## DISCUSSION

The current work describes for the first time the nasopharyngeal microbiota in a case-control study of children with IPD and healthy children. Our data show that bacterial richness and diversity were significantly higher in IPD patients. In such cases, a clear dysbiosis was observed with a high frequency of *Veillonella* and other oral microorganisms which appeared to be relatively absent in controls. This over-representation of anaerobic and proteolytic oral species in children with IPD was also found by Segal et al. (2013) in adult bronchoalveolar lavage samples in association with increased inflammation. In our samples, the microbiota related with IPD was also associated with higher levels of the C-reactive protein inflammatory biomarker.

De Steenhuijsen Pijters et al. (2016) similarly found higher nasopharyngeal microbiota diversity in elderly pneumonia patients compared to elderly healthy controls, whilst this difference was not found in adult patients. In ecological terms, these results are surprising since higher bacterial diversity is usually related with health (Turnbaugh et al., 2007), while lower bacterial diversity is associated with disease. It is noteworthy that patients with primary immunodeficiencies presented a higher microbiota diversity compared with healthy controls. This fact might correlate with an increase of immune system permissiveness for microbe colonization (Oh et al., 2013). Similarly, a local increase in bacterial diversity has been detected in polyps and tumor biopsies from patients with

colorectal cancer (Mira-Pascual et al., 2015), a disease which has been associated with immune suppression at the affected tissues. The best studied case of immune-driven dysbiosis is probably gum disease, where the presence of the “keystone pathogen” *Porphyromonas gingivalis* has been shown to induce a profound alteration of the immune system (Hajishengallis, 2011) facilitating the settlement of many species that produce inflammation. However, the increase in microbial diversity associated with dysbiosis in gum disease and cancer could not only be due to immune alteration but also to a nutritionally richer environment (Mira et al., 2017). In the respiratory tract of children with IPD, future investigations should elucidate whether the observed dysbiosis is a consequence of immune changes, increased nutrient availability or both. In periodontal disease, destructive inflammation generates abundant gum tissue breakdown products that serve as nutrients for proteolytic and saccharolytic bacteria to obtain essential amino-acids and iron, including degraded collagen, and heme-containing compounds (Hajishengallis et al., 2012). It is important to underline that *Porphyromonas* was one of the over-represented genera in IPD patients (Figure 2C). However, all reads belonging to this genus appeared to correspond to uncultured or unknown species (Table 2). We hope the present study stimulates research into the characterization of these potentially pathogenic species, including their potential involvement as keystone pathogens (Darveau et al., 2012).

In addition, IPD samples presented significantly higher levels of *Veillonella* (Figure 2C), which is a bacterium that uses lactate as a carbon source, as a consequence of which it is usually found physically and functionally associated to lactate producers like *Streptococcus* (Dige et al., 2014; Gaspar et al., 2014). In our data, however, the correlation between *Streptococcus* and *Veillonella* levels in cases was not significant ( $R^2 = 0.17$ ,  $p > 0.1$ , Supplementary Figure 3) and therefore it is unknown whether streptococcal serotypes associated with IPD produce more lactate than those found in healthy children. Future work should determine whether the seemingly higher acidic environment in children with IPD is a consequence of lactate production by microorganisms, by lactate-dehydrogenase over-expression in the human tissue (Tan et al., 2002) or both.

Our data identified three bacterial clusters or nasopharyngeal-types, dominated by *Dolosigranulum*, *Streptococcus*, or *Haemophilus*. Similarly, other studies have described the presence of bacterial nasopharyngeal clusters. In a Danish cohort (1–3 months of age) and a Dutch cohort (from birth to 6 months of age), up to 5 and 4 nasopharyngeal-types were described (Mortensen et al., 2016), respectively. Although there are methodological, geographical and age-related differences between these studies, all available data from respiratory tract samples point toward the presence of precise microbial communities with a given dominant bacteria on each nasopharyngeal-type, although larger samples sizes are required to validate this.

In the current manuscript, the only statistically significant explanatory factor for these three microbiota profiles was the classification of patients into case or control groups. *Streptococcus*-dominated community (Microbiota B) was clearly

associated to IPD patients. Given that *Dolosigranulum* abundance in the nasopharynx has been reported to be inversely associated with episodes of wheezing and mild respiratory tract infections (Biesbroek et al., 2014) we speculate that the *Dolosigranulum*-dominated community (Microbiota A) could be more resistant to pneumococcal infection occurrence and severity. Our hypothesis was supported by the lower number of cases with a Microbiota A-type (17.9% of the total) and by the fact that such cases experienced less severe manifestations of IPD and did not require intensive care. In this respect, it is suggestive that *Dolosigranulum* and *Haemophilus* are found in the present study to have a negative correlation with *Streptococcus*, the dominant genera in IPD cases (Figure 4). Moreover, the nasopharyngeal presence of *Dolosigranulum* has been associated with breastfeeding. It has been shown that lactation has a profound impact in the microbial community composition of the infant upper respiratory tract, increasing the prevalence and levels of *Dolosigranulum* and reducing the levels of *Staphylococcus*, *Prevotella*, or *Veillonella* (Biesbroek et al., 2014). In agreement with this, we found a considerably higher proportion of Microbiota A healthy controls that were breastfed and a trend for statistical significance in the relation between exclusive breastfeeding up to 6 months of age and case-control classification ( $p = 0.06$ ) (Table 1). Despite the lack of statistical power to observe significance in these associations, the results obtained suggest that breastfeeding could have an important role in protection against pneumococcal infection. As far as for *Haemophilus*-dominated community (microbiota C), both IPD cases and healthy controls appear to fall within this microbiota profile. This genus, together with *Moraxella*, has been associated with higher rates of parent-reported upper respiratory infections and wheezing in the first years of life (Hyde et al., 2014; Bogaert et al., 2015). In fact, the group of children with *Haemophilus* and *Moraxella*-dominated microbiota showed a higher percentage of patients presenting a respiratory infection in the previous 30 days before the sample collection (68.2%), with a trend for significance ( $p = 0.07$ ). However, future experimental work with a larger sample size should further explore the significance of these microbiota profiles and test whether the presence of a given nasopharyngeal microbiota makes individuals more sensitive or resistant to pneumococcal infection.

Our study describes the use of a long-amplicon sequencing approach of the 16S rRNA for species-level identification. Computer simulations show that taxonomic assignment accuracy, especially at the species level, decreases dramatically in short reads, like those of current Illumina or Ion Torrent technologies (Claesson et al., 2010), while the use of long-amplicon ( $\geq 500$  bp) has been postulated as a good tool for species-level taxonomical assignments (Shin et al., 2016) and has been widely used as a diagnostic tool of bacterial infections in clinical samples (Guembe et al., 2013; Martínez et al., 2016). However, we have found surprising results using 16S rRNA for species level identification since *S. pneumoniae* would be more frequent in controls than in cases. These results are discordant with the results generated from a real-time PCR targeting *LytA* gene, the target recommended by CDC for pneumococcal detection. *LytA* PCR indicated the presence of *S. pneumoniae* in 64.4% of cases vs. 57.1% in controls (Table 1). According to

our results, taxonomic assignment by using 16S rRNA could be limited in some genera and accurate identification at the species level should be done with more conserved genes. It is important to keep in mind that streptococci are particularly similar in the 16S rRNA gene sequence, and therefore species-level assignment in this genus must be treated with caution (Ing et al., 2012). Even more, despite *LytA* is the recommended gene utilized for pneumococcal diagnosis according to CDC (National Center for Immunization and Respiratory Diseases, 2014), this target has been reported to misidentify the pathogen (Morales et al., 2015; Simões et al., 2016), may be showing the occurrence of genetic exchange among streptococcal species and opening the possibility that other etiological agents could be involved. Thus, future work should increase our understanding of these microbial consortia by accurate species-level identification.

## CONCLUSION

In conclusion, we found a higher bacterial diversity and richness in children with IPD which could suggest an impaired immune response. This lack of immune competence could be aggravated by limited breastfeeding lower than recommended by WHO and by the presence of keystone pathogens which need to be characterized and that could favor the overgrowth of many proteolytic anaerobic organisms from the oral cavity, giving rise to a dramatic dysbiosis. From an applied point of view, we found suggestive microbiota profiles associated to IPD (*Streptococcus*-dominated microbiota profile) or asymptomatic colonization (*Dolosigranulum*-dominated microbiota profile) that could be used, respectively, as disease biomarkers or to identify health-associated inhabitants of the respiratory tract. The characterization of beneficial bacteria could be useful to prevent pneumococcal infections by integrating those microorganisms in a probiotic formula. The present study suggests not only respiratory tract samples, but also breast milk, as a potential source of those beneficial bacteria.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Sequence files and metadata for all samples used in this study are stored in the MG-RAST server to be publicly available by accessing the project Invasive Pneumococcal Disease (IPD) in children is associated with a highly diverse nasopharyngeal microbiota: a case-control study, ID mgp80930. All remaining data are contained within the paper and/or Supporting Information Files.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM and CM-A contributed to the conception, design, and analysis of data. DH and JR contributed to the case and control recruitment and microbiological characterization of samples. AC-C and AG contributed to the bioinformatics analysis. PB contributed to the coordination, statistical analysis, and data/sample management. AC-C, PB, AM, and CM-A were the major contributors in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.



## FUNDING

This work was supported in part by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and the Ministry of Science and Innovation, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (<http://www.isciii.es>), Projects of Research on Health [FIS project number PI16/00174, Principal Investigator: CM-A], Predoctoral contract for training in research into Health [Grant number FII17/00248, Recipient: DH] and Sant Joan de Deu Foundation [Grant number AFR2015, Principal Investigator: CM-A] (<http://www.fsjd.org/es>). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Artacho for his help in statistical analysis and The Catalan Study group of host-pathogen interaction in patients with IPD: Maria Andres-Franch, Carlos Bautista, PB, AC-C, Alvaro Díaz, Cristina Esteva, Mariona F. de Sevilla, Ana Fernandez, Miguel Garcia-Fernandez, AG, Carmen Galles, Lourdes Garcia, Juan Jose Garcia-Garcia, Susanna

Hernandez-Bou, Cristian Launes, Francisco Lozano, Carles Luaces, AM, CM-A, Marian Navarro, Daniel Penela, JR, Miriam Triviño, Ana Valero-Rello, Goretta Sauca, Eudal Sellares.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00011/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1 |** Rarefaction curves of individual nasopharyngeal samples in (a) healthy children (controls) and (b) patients with invasive pneumococcal disease (cases). The horizontal axis shows the number of reads (sequencing effort) obtained by pyrosequencing the 16S rRNA gene. The vertical axis shows the number of operational taxonomic units (OTUs) at a level of 97% (estimated number of bacterial species per sample).

**Supplementary Figure 2 |** Heatmap profile showing average abundances of bacterial genera in cases and controls indicating the age of each child. Genera present in <3 patients were removed from the analysis for clarity.

**Supplementary Figure 3 |** Relationships between the levels of *Streptococcus* and *Veillonella* in children's nasopharyngeal samples. Scatterplots show the number of sequence reads in the two bacterial genera for cases (A) and controls (B).

## REFERENCES

- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180. doi: 10.1038/nature09944
- Ballard, O., and Morrow, A. L. (2013). Human milk composition. *Pediatr. Clin. North Am.* 60, 49–74. doi: 10.1016/j.pcl.2012.10.002
- Biesbroek, G., Bosch, A. A. T. M., Wang, X., Keijser, B. J. F., Veenhoven, R. H., Sanders, E. A., et al. (2014). The Impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 298–308. doi: 10.1164/rccm.201401-0073OC
- Bogaert, D., De Steenhuijsen Piters, W. A. A., and Sanders, E. A. M. (2015). The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 370:20140294. doi: 10.1098/rstb.2014.0294
- Bogaert, D., Keijser, B., Huse, S., Rossen, J., Veenhoven, R., van Gils, E., et al. (2011). Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS ONE* 6:e17035. doi: 10.1371/journal.pone.0017035
- Bomar, L., Brugger, S. D., Yost, B. H., Davies, S. S., and Lemon, K. P. (2016). *Corynebacterium accolens* releases antipneumococcal free fatty acids from human nostril and skin surface triacylglycerols. *mBio* 7, e01725–e01715. doi: 10.1128/mBio.01725-15
- Brotos, P., Bassat, Q., Lanaspá, M., Henares, D., Perez-Arguello, A., Madrid, L., et al. (2017). Nasopharyngeal bacterial load as a marker for rapid and easy diagnosis of invasive pneumococcal disease in children from Mozambique. *PLoS ONE* 12:e0184762. doi: 10.1371/journal.pone.0184762
- Brueggemann, A. B., Griffiths, D. T., Meats, E., Peto, T., Crook, D. W., and Spratt, B. G. (2003). Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J. Infect. Dis.* 187, 1424–1432. doi: 10.1086/374624
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M. C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., and Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 544–551. doi: 10.3945/ajcn.112.037382
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi: 10.1038/nmeth.1303
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* 11, 265–270.
- Caesson, M. J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P., et al. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.* 38:e200. doi: 10.1093/nar/gkq873
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., et al. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141–D145. doi: 10.1093/nar/gkn879
- Darveau, R. P., Hajishengallis, G., and Curtis, M. A. (2012). Porphyromonas gingivalis as a potential community activator for disease. *J. Dent. Res.* 91, 816–820. doi: 10.1177/0022034512453589
- de la Cuesta-Zuluaga, J., and Escobar, J. S. (2016). Considerations for optimizing microbiome analysis using a marker gene. *Front. Nutr.* 3:26. doi: 10.3389/fnut.2016.00026
- De Steenhuijsen Piters, W. A. A., Huijskens, E. G. W., Wylie, A. L., Biesbroek, G., van den Bergh, M. R., Veenhoven, R. H., et al. (2016). Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients. *ISME J.* 10, 97–108. doi: 10.1038/ismej.2015.99
- del Amo, E., Brotos, P., Monsonis, M., Triviño, M., Iñigo, M., Selva, L., et al. (2014). High invasiveness of pneumococcal serotypes included in the new generation of conjugate vaccines. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 684–689. doi: 10.1111/1469-0691.12422
- del Amo, E., Selva, L., de Sevilla, M. F., Ciruela, P., Brotos, P., Triviño, M., et al. (2015). Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 705–711. doi: 10.1007/s10096-014-2280-y
- Detlefsen, L., McFall-Ngai, M., and Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449, 811–818. doi: 10.1038/nature06245
- Di Pierro, F., Colombo, M., Zanvit, A., Rizzo, P., and Rottoli, A. S. (2014). Use of *Streptococcus salivarius* K12 in the prevention of streptococcal and viral pharyngotonsillitis in children. *Drug. Healthc. Patient Saf.* 6, 15–20. doi: 10.2147/DHPS.S59665
- Dige, I., Grønkrjær, L., and Nyvad, B. (2014). Molecular studies of the structural ecology of natural occlusal caries. *Caries Res.* 48, 451–460. doi: 10.1159/000357920
- Dray, S., and Dufour, A.-B. (2007). *The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists*. Available online at: <http://www.jstatsoft.org/> (Accessed January 14, 2019).

- Gaspar, P., Al-Bayati, F. A. Y., Andrew, P. W., Neves, A. R., and Yesilkaya, H. (2014). Lactate dehydrogenase is the key enzyme for pneumococcal pyruvate metabolism and pneumococcal survival in blood. *Infect. Immun.* 82, 5099–5109. doi: 10.1128/IAI.02005-14
- Guembe, M., Marin, M., Martin-Rabadan, P., Echenagusia, A., Camunez, F., Rodriguez-Rosales, G., et al. (2013). Use of universal 16S rRNA gene PCR as a diagnostic tool for venous access port-related bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* 51, 799–804. doi: 10.1128/JCM.02414-12
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., et al. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 21, 494–504. doi: 10.1101/gr.112730.110
- Hajishengallis, G. (2011). Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Oral Biosci.* 53, 233–240. doi: 10.2330/joralbiosci.53.233
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., and Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 717–725. doi: 10.1038/nrmicro2873
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schü Tte, U. M. E., Beck, D. L., Abdo, Z., et al. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS ONE* 6:e21313. doi: 10.1371/journal.pone.0021313
- Hyde, E. R., Petrosino, J. F., Piedra, P. A., Camargo, C. A., Espinola, J. A., Mansbach, J. M., et al. (2014). Nasopharyngeal Proteobacteria are associated with viral etiology and acute wheezing in children with severe bronchiolitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1220–1222. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.049
- Ing, J., Mason, E. O., Kaplan, S. L., Lamberth, L. B., Revell, P. A., Luna, R. A., et al. (2012). Characterization of nontypeable and atypical *Streptococcus pneumoniae* pediatric isolates from 1994 to 2010. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1326–1330. doi: 10.1128/JCM.05182-11
- Jeffery, I. B., Claesson, M. J., Toole, P. W. O., and Shanahan, F. (2012). Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 591–592. doi: 10.1038/nrmicro2859
- López-López, A., Camelo-Castillo, A., Ferrer, M. D., Simon-Soro, Á., and Mira, A. (2017). Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: the case of *Streptococcus dentisani*. *Front. Microbiol.* 8:379. doi: 10.3389/fmicb.2017.00379
- Lozupone, C., Hamady, M., and Knight, R. (2006). UniFrac—an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 7:371. doi: 10.1186/1471-2105-7-371
- Martinez, M. J., Massora, S., Mandomando, I., Ussene, E., Jordao, D., Lovane, L., et al. (2016). Infectious cause of death determination using minimally invasive autopsies in developing countries. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 84, 80–86. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.002
- Medina, M., Villena, J., Salva, S., Vintiñi, E., Langella, P., and Alvarez, S. (2008). Nasal administration of *Lactococcus lactis* improves local and systemic immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol. Immunol.* 52, 399–409. doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00050.x
- Meningitis (2011). *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis*. CDC. Available online at: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/index.html> (Accessed January 14, 2019).
- Michener, C. D., and Sokal, R. R. (1957). A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 11, 130–162. doi: 10.2307/2406046
- Mira, A., Simon-Soro, A., and Curtis, M. A. (2017). Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J. Clin. Periodontol.* 44, S23–S38. doi: 10.1111/jcpe.12671
- Mira-Pascual, L., Cabrera-Rubio, R., Ocon, S., Costales, P., Parra, A., Suarez, A., et al. (2015). Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J. Gastroenterol.* 50, 167–179. doi: 10.1007/s00535-014-0963-x
- Morales, M., Martín-Galiano, A. J., Domenech, M., and García, E. (2015). Insights into the evolutionary relationships of LytA autolysin and ply pneumolysin-like genes in *Streptococcus pneumoniae* and related Streptococci. *Genome Biol. Evol.* 7, 2747–2761. doi: 10.1093/gbe/evv178
- Mortensen, M. S., Brejnrod, A. D., Roggenbuck, M., Abu Al-Soud, W., Balle, C., Krogfelt, K. A., et al. (2016). The developing hypopharyngeal microbiota in early life. *Microbiome* 4:70. doi: 10.1186/s40168-016-0215-9
- National Center for Immunization and Respiratory Diseases (2014). *PCR for Detection and Characterization of Bacterial Meningitis Pathogens: Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae*.
- Oh, J., Freeman, A. F., NISC Comparative Sequencing Program, Park, M., Sokolic, R., Candotti, F., et al. (2013). The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies. *Genome Res.* 23, 2103–2114. doi: 10.1101/gr.159467.113
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2018). *Community Ecology Package*. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> (Accessed November 22, 2018).
- Selman, D. A. (2012). The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutr. Rev.* 70, S2–S9. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00489.x
- Segal, L. N., Alekseyenko, A. V., Clemente, J. C., Kulkarni, R., Wu, B., Gao, Z., et al. (2013). Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome* 1:19. doi: 10.1186/2049-2618-1-19
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., et al. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12:R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Selva, L., Berger, C., Garcia-Garcia, J. J., de Paz, H., Nadal, D., and Muñoz-Almagro, C. (2014). Direct identification of *Streptococcus pneumoniae* capsular types in pleural fluids by using multiplex PCR combined with automated fluorescence-based capillary electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2736–2737. doi: 10.1128/JCM.00906-14
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379–423. doi: 10.1145/584091.584093
- Shin, J., Lee, S., Go, M. J., Lee, S. Y., Kim, S. C., Lee, C. H., et al. (2016). Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Sci. Rep.* 6, 1–10. doi: 10.1038/srep29681
- Simões, A. S., Tavares, D. A., Rolo, D., Ardanuy, C., Goossens, H., Henriques-Normark, B., et al. (2016). LytA-based identification methods can misidentify *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 85, 141–148. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.018
- Simón-Soro, A., Guillen-Navarro, M., and Mira, A. (2014). Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J. Oral Microbiol.* 6:25443. doi: 10.3402/jom.v6.25443
- Sleeman, K. L., Griffiths, D., Shackley, F., Diggle, L., Gupta, S., Maiden, M. C., et al. (2006). Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J. Infect. Dis.* 194, 682–688. doi: 10.1086/505710
- Tagg, J. R., and Dierksen, K. P. (2003). Bacterial replacement therapy: adapting “germ warfare” to infection prevention. *Trends Biotechnol.* 21, 217–223. doi: 10.1016/S0167-7799(03)00085-4
- Tan, T. Q., Mason, E. O., Wald, E. R., Barson, W. J., Schutze, G. E., Bradley, J. S., et al. (2002). Clinical characteristics of children with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 110, 1–6. doi: 10.1542/peds.110.1.1
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., and Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature* 449, 804–810. doi: 10.1038/nature06244
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., et al. (2008). The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 241–250. doi: 10.1016/j.syapm.2008.07.001
- Zhu, B., Wang, X., and Li, L. (2010). Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell* 1, 718–725. doi: 10.1007/s13238-010-0093-z

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Camelo-Castillo, Henaes, Brotons, Galiana, Rodriguez, Mira and Muñoz-Almagro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Resumen primer artículo

Estudio observacional prospectivo de tipo caso-control en el que se incluyeron todos los niños <18 años con enfermedad neumocócica invasiva (ENI) admitidos en cinco hospitales de Cataluña (Hospital Sant Joan de Déu, Hospital de Nens, Hospital de Mataró, Hospital de Vic y Hospital de Calella) y con consentimiento para participar en el estudio, entre enero de 2014 y marzo de 2015.

El diagnóstico microbiológico de ENI consistió en el aislamiento de neumococo por cultivo o la detección de ADN de neumococo por PCR en muestras normalmente estériles (sangre, líquido cefalorraquídeo o líquido pleural). Cada caso se pareó por sexo, edad y estacionalidad con un control sano reclutado en el laboratorio cuando acudía para una extracción sanguínea previa a cirugía menor (p. ej. fimosis).

Se recogió información clínica, inmunológica y epidemiológica de cada sujeto reclutado, incluyendo la duración de la lactancia materna, el estado de vacunación neumocócica y la exposición previa a antibióticos. Se extrajo una muestra de aspirado nasofaríngeo de cada individuo donde se realizó la detección y cuantificación de neumococo por PCR *lytA*, el tipado capsular mediante técnicas moleculares basadas en análisis automatizado de fragmentos fluorescentes y la detección de dieciséis virus respiratorios utilizando un panel de PCR múltiple. Además, se realizó la pirosecuenciación de la región V1-V4 del gen ARNr 16S con la plataforma 454 GS FLX de Roche. Posteriormente se procesaron y analizaron las secuencias.

Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

- Se diagnosticaron un total de 53 pacientes con ENI en los centros de estudio, y 42 aceptaron participar. Sin embargo, tan sólo se disponía de 28 controles sanos para el emparejamiento, lo que implicó que el estudio finalmente incluyera 56 pacientes.

### ***Características epidemiológicas y clínicas de los casos de ENI***

- La mediana de edad de los casos fue de 43 meses (Rango intercuartil [RI]: 20.8–60.2 meses) y el 57.1% fueron varones (n=16).
- La principal manifestación clínica fue la neumonía (n=19), seguida de bacteriemia (n=7), meningitis (n=1) y sepsis (n=1).
- La mediana de días de hospitalización fue de 7 días (RI: 4–8 días). El 17.9% de los casos ingresó en UCI (n=5), el 14.3% sufrió secuelas (n=4) y un niño falleció.

- Todos los pacientes habían estado expuestos a antibióticos betalactámicos previo a la recogida de la muestra durante una media de cuatro días.

#### **Características epidemiológicas y microbiológicas en casos vs. controles**

- La proporción de infección viral (60.7% vs. 50.0%) y tasa de portadores de neumococo (64.3% vs. 57.1%) fue mayor en casos que en controles, aunque sin diferencias significativas.
- Se detectó mayor proporción de serotipos cubiertos por la VNC13 (61.1% vs. 12.5%,  $P=0.004$ ) o invasivos (55.5% vs. 12.5%,  $P=0.009$ ) en los casos de ENI.
- Se observó una asociación positiva con tendencia estadística entre una duración de la lactancia materna  $\geq 6$  meses y controles sanos (68.4% vs. 39.1%,  $P=0.06$ ).

#### **Análisis de diversidad alfa**

- Los niños con ENI presentaron mayor riqueza (media Chao1 casos=79.0, IC [Intervalo de confianza]: 57.4-100.6/media Chao1 controles=47.8, IC: 37.5-58.2) ( $P<0.001$ ) y diversidad bacteriana (media Shannon casos=1.21, IC: 0.94-1.48/media Shannon controles=0.77, IC: 0.62-0.92) ( $P<0.001$ ) que los controles sanos.

#### **Análisis taxonómico**

- Los géneros más prevalentes en el grupo de casos fueron *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Dolosigranulum*, *Veillonella* y *Staphylococcus* con 26.4%, 21.1%, 16.8%, 9.3%, 6.1% y 5.2% de secuencias asignadas a estos géneros, respectivamente.
- Los géneros más prevalentes en los controles sanos fueron *Haemophilus*, *Moraxella*, *Dolosigranulum*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Veillonella* con 34.5%, 27.1%, 15.7%, 9.0%, 8.9% y 0.1% de secuencias asignadas a estos géneros, respectivamente.
- El género *Staphylococcus* estaba dominado por secuencias asignadas a nivel de especie a *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* en casos de ENI, mientras que en los controles sanos dominó *Staphylococcus aureus* ( $>40.0\%$  de las secuencias).
- El 94.9% de las secuencias asignadas a *Moraxella* en casos de ENI se asignaron a nivel de especie a *Moraxella catarrhalis*, mientras que más de un 15.0% de las secuencias en controles se correspondieron con especies de *Moraxella* comensales, incluyendo *Moraxella lincolnii*, *Moraxella lacunata* o *Moraxella nonliquefaciens*.

- Tan solo el 51.1% de las secuencias asignadas al género *Streptococcus* se correspondieron con *Streptococcus pneumoniae* en los casos de ENI, mientras que más del 40.0% de las secuencias se asignaron a *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y otras especies estreptocócicas en este grupo. Por el contrario, más del 90.0% de secuencias asignadas al género *Streptococcus* se identificaron como *Streptococcus pneumoniae* en el grupo de controles sanos.

#### **Análisis de abundancia diferencial**

- LEfSe demostró que la mayor riqueza y diversidad observada en casos de ENI se debía a una mayor abundancia de los géneros *Streptococcus* y *Veillonella*, así como también a una mayor abundancia de géneros típicos de la cavidad oral con baja frecuencia en el conjunto de datos: *Megasphaera*, *Atopobium*, *Oribacterium*, *Prevotella*, *Granulicatella*, *Porphyromonas*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Lachnoanaerobaculum*, *Capnocytophaga*, *Alloprevotella* y *Acinetobacter*.
- *Staphylococcus* y *Moraxella* se asociaron con los niños sanos.

#### **Análisis de diversidad beta**

- El análisis de componentes principales reveló que las muestras se agrupaban en tres perfiles de microbiota nasofaríngea distintos ( $P < 0.01$ ): microbiota A, dominada por los géneros *Dolosigranulum* y *Moraxella*; microbiota B, dominada por *Streptococcus* y *Staphylococcus* y una gran diversidad de géneros orales y anaerobios como *Veillonella*, *Prevotella* y *Porphyromonas*; y microbiota C, que principalmente contenía *Haemophilus* y *Moraxella*.
- El único factor que explicó la distribución de las muestras en los tres perfiles fue la clasificación de los pacientes en enfermos o sanos ( $P = 0.006$ ).
- La microbiota A presentó una mayor proporción de individuos sanos y una proporción muy baja de pacientes enfermos (casos=17.9%, controles sanos=82.1%).
- Aunque no significativo, el 90.0% de los controles sanos con microbiota A, rica en *Moraxella* y *Dolosigranulum*, habían sido alimentados con leche materna, en comparación con tan solo el 33.3% y el 60.0% de los controles sanos con microbiota B y C, dominada por patobiontes.

#### **Correlaciones bacterianas**

- Se identificaron correlaciones negativas entre los géneros dominantes: *Dolosigranulum-Streptococcus* ( $P = 0.03$ ), *Dolosigranulum-Haemophilus* ( $P = 0.01$ ), *Streptococcus-Haemophilus* ( $P = 0.03$ ).



## Segundo artículo

### **Differential nasopharyngeal microbiota composition in children according to respiratory health status**

*"Composición de microbiota nasofaríngea diferencial en función del estado de salud  
respiratoria en niños"*

*Microb Genom.* 2021 Oct;7(10):000661. doi: 10.1099/mgen.0.000661

**Henares D**, Brotons P, de Sevilla MF, Fernandez-Lopez A, Hernandez-Bou H,  
Perez-Argüello A, Mira A, Muñoz-Almagro C, Cabrera-Rubio R





## Differential nasopharyngeal microbiota composition in children according to respiratory health status

Desiree Henares<sup>1,2</sup>, Pedro Brotons<sup>1,2,3</sup>, Mariona F. de Sevilla<sup>2,4</sup>, Ana Fernandez-Lopez<sup>4</sup>, Susanna Hernandez-Bou<sup>5</sup>, Amaresh Perez-Argüello<sup>1</sup>, Alex Mira<sup>2,6</sup>, Carmen Muñoz-Almagro<sup>1,2,3,\*</sup>, † and Raul Cabrera-Rubio<sup>7,8†</sup>

### Abstract

Acute respiratory infections (ARIs) constitute one of the leading causes of antibiotic administration, hospitalization and death among children <5 years old. The upper respiratory tract microbiota has been suggested to explain differential susceptibility to ARIs and modulate ARI severity. The aim of the present study was to investigate the relation of nasopharyngeal microbiota and other microbiological parameters with respiratory health and disease, and to assess nasopharyngeal microbiota diagnostic utility for discriminating between different respiratory health statuses. We conducted a prospective case-control study at Hospital Sant Joan de Deu (Barcelona, Spain) from 2014 to 2018. This study included three groups of children <18 years with gradual decrease of ARI severity: cases with invasive pneumococcal disease (IPD) (representative of lower respiratory tract infections and systemic infections), symptomatic controls with mild viral upper respiratory tract infections (URTI), and healthy/asymptomatic controls according to an approximate case-control ratio 1:2. Nasopharyngeal samples were collected from participants for detection, quantification and serotyping of pneumococcal DNA, viral DNA/RNA detection and 16S rRNA gene sequencing. Microbiological parameters were included on case-control classification models. A total of 140 subjects were recruited (IPD=27, URTI=48, healthy/asymptomatic control=65). Children's nasopharyngeal microbiota composition varied according to respiratory health status and infection severity. The IPD group was characterized by overrepresentation of *Streptococcus pneumoniae*, higher frequency of invasive pneumococcal serotypes, increased rate of viral infection and underrepresentation of potential protective bacterial species such as *Dolosigranulum pigrum* and *Moraxella lincolnii*. Microbiota-based classification models differentiated cases from controls with moderately high accuracy. These results demonstrate the close relationship existing between a child's nasopharyngeal microbiota and respiratory health, and provide initial evidence of the potential of microbiota-based diagnostics for differential diagnosis of severe ARIs using non-invasive samples.

### DATA SUMMARY

Raw sequence files have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession

number PRJEB41741. The metadata file, the nucleotide sequences of the OTUs (operational taxonomic units), the OTU table (clean), the corresponding taxonomic

Received 09 December 2020; Accepted 29 July 2021

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Institut de Recerca Sant Joan de Deu, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>CIBER Center for Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>3</sup>School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Pediatric Department, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Pediatric Emergency Department, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Department of Health and Genomics, Center for Advanced Research in Public Health, FISABIO, Valencia, Spain; <sup>7</sup>Teagasc Food Research Centre (TEAGASC), Moorepark, Fermoy, Cork, Ireland; <sup>8</sup>APC Microbiome Institute, University College Cork, County Cork, Ireland.

\*Correspondence: Carmen Muñoz-Almagro, cma@sjdhospitalbarcelona.org; cmunoz@uic.es

**Keywords:** children; *Dolosigranulum*; IPD; microbiota-based diagnostics; nasopharyngeal microbiota; viral URTIs.

**Abbreviations:** ANCOVA, analysis of covariance; ARI, acute respiratory infection; AUC, area under the curve; CCA, canonical correspondence analysis; CI, confidence interval; HSJD, Hospital Sant Joan de Deu; IPD, invasive pneumococcal disease; IQR, inter-quartile range; LDA, linear discriminant analysis; LEfSe, linear discriminant analysis effect size; LRTI, lower respiratory tract infection; NP, nasopharyngeal; NPA, nasopharyngeal aspirate; OTU, operational taxonomic unit; PCV, pneumococcal conjugate vaccine; PERMANOVA, permutational multivariate analysis of variance; PICU, Paediatric Intensive Care Unit; RF, random forest; ROC, receiver operating characteristic; URT, upper respiratory tract; URTI, upper respiratory tract infection; WHO, World Health Organization.

Raw sequences have been deposited in the European Nucleotide Archive under accession number PRJEB41741.

†These authors share senior authorship.

**Data statement:** All supporting data, code and protocols have been provided within the article or through supplementary data files. Five supplementary tables and eight supplementary figures are available with the online version of this article.

000661 © 2021 The Authors



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

classifications, the phylogenetic tree, and the Appendices S1, and S2 have been deposited in the Figshare repository: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13280435.v2>. The rest of data can be found in Figs S1–S8 and Tables S1–S5, available with the online version of this article.

## INTRODUCTION

Acute respiratory infections (ARIs) constitute the second highest cause of mortality among children under 5 years old, accounting for approximately 15% of all deaths in this age range [1, 2]. ARIs are also an important part of the morbidity and constitute one of the main reasons for antibiotic administration in children [3]. Common bacterial pathogens causing ARIs, such as *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*, are frequent colonizers of healthy children's nasopharynx [4], but also an important cause of serious disease [5]. In particular, *S. pneumoniae* nasopharyngeal carriage rates can be as high as 95% among children <3 years old [5]. However, this pathobiont may invade sterile tissues, producing invasive pneumococcal disease (IPD) with a wide range of serious clinical manifestations, such as pneumonia, sepsis and meningitis [5]. The transition processes from balanced colonization states to IPD are not completely understood. Although carriage of especially invasive serotypes may play a role [6], increased recognition is being paid to the consideration of respiratory infections as the outcome of an imbalanced interplay between environmental and life-style determinants, and host and microbial factors. Among the latter, the commensal microbiota of the upper respiratory tract (URT) has been suggested to influence differential susceptibility to and severity of IPD [4].

The respiratory microbiome is composed of an intricate network of bacteria, viruses, fungi, bacteriophages, archaea and eukaryotes that colonize the mucosal surfaces of the respiratory tract and continuously interact with each other and with the host and the environment [4]. This colonization process begins early at birth, with very unstable initial communities that are heavily influenced by an infant's environmental exposures. Through the first years of life, the respiratory microbiome undergoes continuous changes until achieving an adult-like stabilized structure [7]. Despite high variability of the microbiome in early life, the initial colonization by keystone pathogens has been proposed to be determinant on the future health of the infant and even on that of the adult [8]. Particularly, a recent study showed that nasopharyngeal microbiota profiles characterized by *Corynebacterium* and *Dolosigranulum* early in life and *Moraxella* at 4–6 months were associated with lower rates of respiratory events in the subsequent months [9]. In addition, vaginal delivery, breastfeeding and vaccination strategies have been reported to drive beneficial effects on respiratory health through their influence in modulation of commensal microbiota from the URT at initial ages [10–12]. The consistency and importance of these findings are under discussion [13–15].

### Impact Statement

Acute respiratory infections (ARIs) are a leading cause of children's morbidity/mortality. Common pathogens causing ARIs are frequent colonizers of healthy children's nasopharynx. The surrounding micro-environment has been suggested to play a role in the transition of these pathogens to ARIs and modulate its severity. Our case-control study demonstrated a close relationship between a child's nasopharyngeal microbiota and respiratory health status by identifying specific microbiota profiles and species associated with health and/or ARI states. Microbiota-based classification models enabled accurate differentiation of severe ARIs requiring hospitalization. These results can help to improve preventive strategies and non-invasive diagnosis of severe ARIs.

Antibiotics and viral infections have been described as frequent and important events disturbing normal development of healthy infant respiratory microbiota. A reduction of the commensal microbiota, such as *Corynebacterium* or *Dolosigranulum*, while displaying enrichment of bacterial pathogens, has been observed associated with antibiotic consumption or during upper respiratory tract infections (URTIs), including those of viral aetiology [7, 13, 16–18]. Moreover, recent literature concluded that influenza A viral infections perturb the core URT microbiome via direct and indirect processes that could facilitate bacterial co-infections, suggesting that viral–bacterial interactions in the ecological niche may be of extreme relevance to the pathogenesis of ARIs [19]. Of note, the low accuracy of current microbiological methods to distinguish viral from bacterial ARIs is a major cause of unnecessary use of antibiotics [20]. Altogether, an imbalanced state and dysbiosis of the URT microbiota may reduce its capability to perform vital functions, including pathogen colonization resistance, and containment of pathogenic overgrowth and invasion, tipping the balance towards progression to URTIs and lower respiratory tract infections (LRTIs), such as pneumonia, as well as to systemic infections [21–24].

The primary objective of this study was to investigate the relation of children's nasopharyngeal microbiota with ARI across three respiratory health statuses: IPD (a condition representative of LRTIs and systemic infection), self-limiting viral respiratory infections (a condition representative of URTIs), and respiratory health/asymptomatic colonization. A secondary objective was to assess nasopharyngeal microbiota diagnostic utility for differentiating between these different respiratory states. Our underlying hypotheses were that specific microbiota compositions are correlated with different respiratory infectious disease and health states, and have diagnostic value to differentiate one from another. In addition, this study assessed the influence of different environmental variables on microbiota composition.

## METHODS

### Study design and setting

This was a prospective case–control study conducted at Hospital Sant Joan de Deu (HSJD) Barcelona Children's Hospital, a reference university medical centre located in Barcelona, Spain, during the period from January 2014 to December 2018. The study setting annually manages 22% of the total paediatric hospitalizations across Catalonia, a region with a paediatric population of around 1 500 000 subjects. Three groups of children were selected for the study: (i) a case group of inpatients with IPD; (ii) a control group of outpatients with microbiologically confirmed symptomatic viral URIs; (iii) and a control group of healthy or asymptomatic outpatients.

### Case and control definitions

Cases were patients less than 18 years of age admitted to HSJD with clinical suspicion of IPD and microbiological confirmation by isolation of *S. pneumoniae* and/or DNA detection of *S. pneumoniae* in any normally sterile body fluid. Cases were frequency-paired by age, sex and seasonality with controls. Controls were symptomatic children attending the Emergency Department of HSJD and being discharged to home with clinical and microbiological diagnosis of viral URTI (approximate case–control ratio 1:2), as well as healthy/asymptomatic children attending HSJD for a routine well-child check-up or for a blood extraction before minor surgery (such as circumcisions, correction of bone fractures, removal of skin lesions, hernia repairs, etc.) (approximate case–control ratio 1:2). Clinicians evaluated and confirmed the healthy/asymptomatic state of these controls.

Inclusion criteria for cases and controls were: (i) meeting the case/control definition described above, (ii) signed informed consent by the parents or legal guardians, (iii) not belonging to a previously defined clinical risk group for developing IPD, and (iv) no antibiotic exposure before nasopharyngeal sample collection for healthy/URTIs controls or no antibiotic exposure/antibiotic exposure  $\leq 24$  h for IPD cases [7, 15, 25].

Clinical risk factors for developing IPD include asplenia or spleen dysfunction, chronic lower respiratory tract diseases, respiratory conditions caused by aspiration, diabetes, immunosuppression (due to disease or treatment), exposure to a high dose of systemic steroids, cochlear implants, cerebrospinal fluid leaks, and chronic heart, kidney and liver diseases [26].

### Data collection

A series of relevant epidemiological, clinical and microbiological data were recorded from each participant. Epidemiological variables included delivery mode, ethnicity, maternal breastfeeding duration according to World Health Organization (WHO) recommendations (duration  $\geq 6$  months) and pneumococcal vaccination status [categorized into non-vaccinated children or children with  $\geq 1$  dose of 7, 10 or 13-valent pneumococcal conjugate vaccines (PCVs)]. Clinical

diagnosis, length of hospital stay, admission to the Paediatric Intensive Care Unit (PICU), length of PICU stay and patient evolution were collected from cases with IPD. Among microbiological variables, we determined for all participants: respiratory viral species present in the nasopharynx, nasopharyngeal bacterial microbiota, pneumococcal colonization status, pneumococcal nasopharyngeal load, invasiveness disease potential of nasopharyngeal pneumococcal serotypes and their inclusion in PCV13. Serotypes 1, 3, 4, 5, 7F, 8, 9A, 9V, 12F, 14, 18C and 19A were considered as high invasive disease potential serotypes according to previous literature [27–29]. A detailed list and description of variables collected is included in the metadata file (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13280435.v2>).

### Sample collection

Invasive samples (blood, pleural fluid and cerebrospinal fluid) were collected from patients with clinical suspicion of IPD for microbiological diagnosis. Nasopharyngeal aspirates (NPAs) were collected from all cases and controls included in the study. Nasopharyngeal secretions were aspirated using a catheter connected to a vacuum source. The mucus collected within the catheter was then eluted by the aspiration of 1.0 ml sterile PBS). The sample was aliquoted and conserved at  $-80$  °C until further microbial analyses.

### Laboratory analyses

#### DNA/RNA extraction procedures

Bacterial DNA was extracted from *S. pneumoniae*-positive invasive samples and NPAs by the automated system NucliSENS easyMag (bioMérieux) from a total sample volume of 400  $\mu$ l into a final elution volume of 110  $\mu$ l for pneumococcal detection/quantification/serotyping. A NPA volume of 400  $\mu$ l eluted in 25  $\mu$ l was utilized for microbiota analyses. The NucliSENS easyMag is an automated system for total nucleic acid extraction that utilizes magnetic silica particles. No additional treatments were performed before nucleic acid extraction for microbiota analyses. Nucleic acids were extracted with the MagNA Pure Compact total nucleic acid isolation kit I (Hoffmann-La Roche) from an initial sample volume of 200  $\mu$ l into a final elution volume of 100  $\mu$ l for viral DNA/RNA detection.

#### Pneumococcal detection, quantification and serotyping

A duplex real-time PCR targeting the *lytA* gene and *RNase P* (single-copy gene of the human genome used as an amplification control) was used for pneumococcal DNA detection/quantification in invasive samples and NPAs [30]. Primers and probes were those recommended by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Blood agar plates (Columbia agar supplemented with 5% sheep blood; bioMérieux) were utilized for the isolation of pneumococcal strains directly from invasive samples or from positive blood cultures. Standard microbiological tests were performed for *S. pneumoniae* identification, including the study of sensitivity by optochin tests [30]. Culture, PCR or both microbiological methods were routinely performed on invasive samples from

patients with clinical suspicion of IPD according to paediatrician's criteria. All invasive and colonizing *S. pneumoniae* detected were further serotyped (Appendix S1).

#### Viral RNA/DNA detection

All NPAs were tested using the multiplex real-time PCR Anyplex II RV16 detection kit (Seegene). This system is able to detect and differentiate DNA/RNA from 15 of the most frequent human respiratory viruses (metadata file – <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13280435.v2>).

#### Bacterial 16S rRNA sequencing

PCR amplification of the V3-V4 region from the 16S rRNA gene generated amplicons of approximately 465 bp in length. These amplicons were pooled and sequenced with the MiSeq platform (Illumina). Samples were sequenced in four different runs and 16 negative controls were included. A complete description of the sequencing procedure and negative controls included is specified in Appendix S1.

#### Bioinformatics procedures

Filtering of raw reads by sequence quality and length was performed with PRINSEQ-Lite v0.20.4 [31]. FLASH v1.2.11 was utilized for merging paired-end reads [32]. Only those samples with  $\geq 30\,000$  high-quality sequences were included for subsequent analyses. Sequences were dereplicated with Vsearch v2.13.3 and clustered into OTUs (operational taxonomic units) at 97% of identity with the UPARSE-algorithm-based approach from Usearch [33]. Vsearch removed chimerical OTUs applying a reference-based approach with the Gold database from the Broad Microbiome Utilities version microbiomeutil-r20110519 (<https://sourceforge.net/projects/microbiomeutil/files/>). The RDP Classifier v.2.12 [34] taxonomically assigned OTUs up to genus level with a minimum confidence threshold of 80%, while SPINGO assigned OTUs at the species level with a confidence value  $>75\%$  [35]. The phylogenetic tree was reconstructed using PyNAST v0.1 [36] and Qiime 1 scripts [37] (filter\_alignment.py and make\_phylogeny.py with the fasttree method). Negative controls were evaluated for removal of contaminant OTUs: an abundance ratio that considers prevalence and abundance of OTUs in negative controls and biological samples was applied to the data. Additionally, the Decontam package was used for stricter contaminant elimination [38]. For alpha-diversity analyses, the count table was rarefied to 30 000 sequences per sample. For the rest of the analyses [beta-diversity, differential abundance testing and random forest (RF) analyses], the unrarefied count table was filtered by keeping OTUs with a relative abundance  $>0.1\%$  in at least 10% of samples. This cut-off was applied with the objective of performing the analyses based on representative taxa, since low count and low prevalent sequences tend to represent sequencing artefacts, contaminants or transient micro-organisms without a real biological role in the studied niche [39, 40], and to assure that the taxa under consideration would be meaningful for class separation [41]. Data normalization was conducted by log-transformation of the unrarefied and filtered OTU table

using  $\log_{10}(x+1)$  prior to beta-diversity and RF analyses. A relative abundance table was the input required for differential abundance testing using Linear Discriminant analysis Effect Size (LEfSe). Complete descriptions of the bioinformatics procedures are specified in Appendices S1 and S2, including a detailed explanation of OTU table clean-up steps.

#### Statistical analyses

All statistical analyses were performed with R version 3.6.0 [42]. Normality of the data was evaluated with Shapiro–Wilk test. Continuous variables were described as mean and standard deviation (SD) or median and inter-quartile range (IQR) in the case of parametric and non-parametric variables, respectively. Significance of continuous and normally distributed data were tested by ANOVA for overall group comparisons and Tukey HSD when looking for specific mean differences between groups. In the case of non-parametric data, Kruskal–Wallis and pairwise Wilcoxon tests were performed. When analysing categorical data, significance was established through Chi-square test or Fisher's exact test if  $\geq 25\%$  of cells presented expected frequencies  $\leq 5$ . Pairwise Chi-square or pairwise Fisher's exact test were used for specific data distribution differences between groups.

Differences in species richness and diversity according to respiratory infectious disease and health states were assessed by testing the significance of Chao1 and Shannon indexes using Kruskal–Wallis and pairwise Wilcoxon tests. Overall differences in microbiota composition between states were assessed by PERmutational Multivariate ANalysis Of Variance (PERMANOVA) from Vegan (Adonis 2 function) [43] using a Bray–Curtis dissimilarity measure. Specific differences between groups were assessed by *post hoc* comparisons with Adonis pairwise comparisons. PERMANOVA models and Adonis pairwise comparisons were repeated with Jaccard and weighted Unifrac distance matrices and visualized with principal coordinate analyses (PCoAs). With the objective of identifying other sources influencing nasopharyngeal microbiota structure, the significance of Chao1, Shannon and PERMANOVA models were also tested according to other described environmental variables relevant for microbiota composition and diversity (age, gender, breastfeeding duration  $\geq 6$  months, pneumococcal vaccination and viral infection) [7, 44, 45]. The effect of sequencing run was also evaluated in alpha- and beta-diversity analyses in order to control for the possible confounding effect of differential sequencing depth among runs. Additionally, a canonical correspondence analysis (CCA) triplot was constructed showing the relation between nasopharyngeal samples, bacterial genera detected and the significant variables influencing beta-diversity as determined by PERMANOVA models. LEfSe was performed in order to discover specific bacterial biomarkers associated with health and disease states, as well as with environmental variables [46]. Adopting a stringent criterion, bacterial taxa were considered relevant if presenting a linear discriminant analysis (LDA) score  $\geq 3.0$ . Bacterial interrelations were evaluated by calculating Spearman's correlations between dominant genera of nasopharyngeal

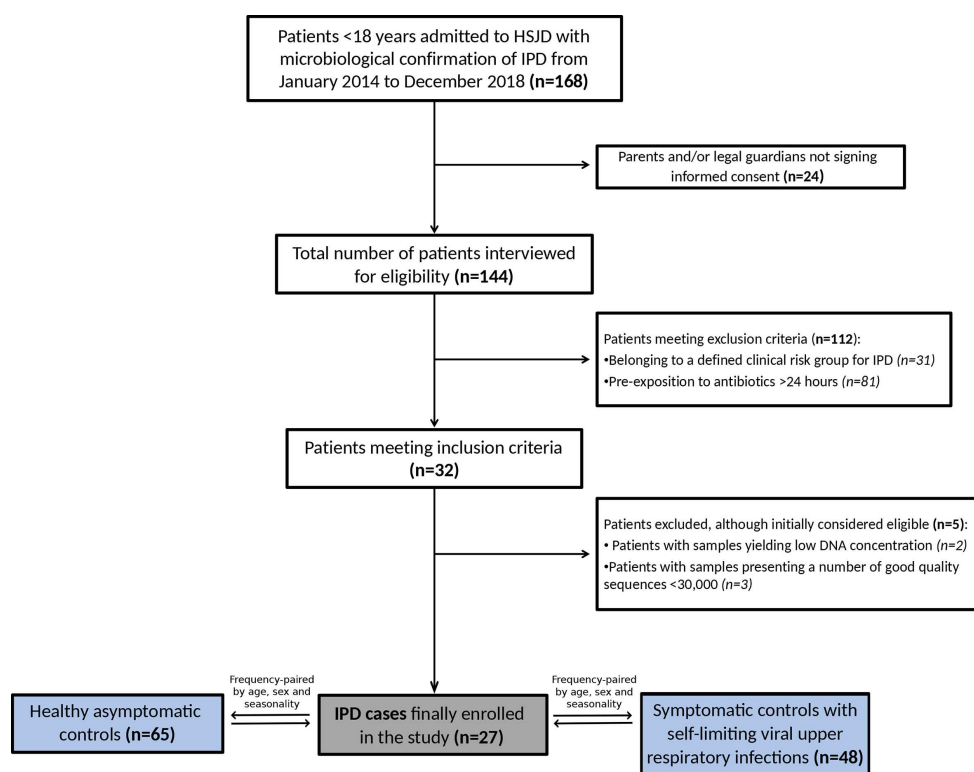


Fig. 1. Flowchart of patients. Description of the IPD case selection process.

microbiota. RF was used for building case-control classification models including all microbiological variables assessed in nasopharyngeal samples as a machine-learning approach for distinguishing cases from controls. Three different RF models were constructed for classification of: (i) IPD cases versus viral URTI controls, (ii) IPD cases versus healthy controls, and (iii) IPD cases versus all controls. RF performance was evaluated by the area under the curve (AUC) parameter. The importance of the variables to the performance of each RF model was measured by mean decrease in Gini index. The Benjamin-Hochberg method was used for *P* value corrections in the case of multiple testing. Further information on statistical tests and R packages utilized for the analyses are detailed in Appendices S1 and S2.

## RESULTS

### Clinical, epidemiological and microbiological features of participants

A total of 27 IPD cases, 48 viral URTI controls and 65 healthy/asymptomatic controls were finally enrolled in the study (Fig. 1). The median age of cases was 33 months (IQR: 19.0–49.5 months) and 55.6% were female. The main clinical IPD manifestation was bacteraemic pneumonia, which accounted

for 85.2% ( $n=23$ ) of cases, including complicated pneumonia with empyema ( $n=16$ , 59.3%) and non-complicated pneumonia ( $n=7$ , 25.9%). In addition, meningitis and occult bacteraemia occurred in 11.1% ( $n=3$ ) and 3.7% ( $n=1$ ) of cases, respectively. Detection of *S. pneumoniae* in normally sterile body fluids was performed by culture ( $n=3$ , 11.1%), PCR ( $n=16$ , 59.2%) or both culture and PCR ( $n=8$ , 29.6%). Invasive sample types positive for *S. pneumoniae* included blood ( $n=25$ , 92.6%), pleural fluid ( $n=10$ , 37.0%) and cerebrospinal fluid ( $n=3$ , 11.1%) specimens. The median length of hospital stay was 11 days (IQR: 8.0–15.0 days). A proportion of 14.8% ( $n=4$ ) of cases required admission to the PICU, with a median stay of 2.5 days (IQR: 1.7–3.5 days). The majority of IPD cases evolved favourably ( $n=24$ , 88.9%), except for three patients who presented sequelae 6 months after episode onset (11.1%; two cases of meningitis and one case of complicated pneumonia). No deaths occurred in our study population.

The three groups of the study did not significantly differ in age, sex or seasonality (Table 1). However, IPD cases were more likely to present a history of gastrointestinal symptoms in the previous month, high leucocyte levels or low haemoglobin levels at admission blood testing than viral URTI and

healthy/asymptomatic controls (Table 1). In addition, median duration of fever before NPA collection was higher in IPD cases (120.0 h, IQR 78.0–144.0 h) than in viral URTI controls (24.0 h, IQR 12.0–48.0 h;  $P < 0.001$ ). Kindergarten attendance and non-white ethnicity were significantly associated with viral URTI controls in comparison to those who were healthy/asymptomatic.

Pneumococcal colonization was strongly related to the IPD group: 100.0 % ( $n=27$ ) of cases were pneumococcal nasopharyngeal carriers compared to 52.1 % ( $n=25$ ) of viral URTI controls and 62.5 % ( $n=40$ ) of healthy/asymptomatic controls. Higher pneumococcal nasopharyngeal load values were also quantified in the IPD group compared to the two control groups. Furthermore, pneumococcal serotypes detected among children with IPD were significantly more likely to be included in PCV13 and to present higher invasive disease potential than serotypes detected in control groups. Notably, none of the serotypes identified among viral URTI controls were classified as high invasive disease potential serotypes. A higher prevalence of viral infection was associated with IPD cases compared to healthy/asymptomatic controls. Table 1 details the clinical, epidemiological and microbiological characteristics of participants.

#### Nasopharyngeal microbiota parameters according to respiratory health status and environmental factors

A total of 11 769 440 good quality sequences were obtained from samples and negative controls (Table S1). Overall, these sequences were clustered into 726 OTUs; however, 124 OTUs were considered as contaminant OTUs and removed. Such contaminant OTUs accounted for 10 375 sequences in negative controls (median=419, IQR=149–711) and 57 847 sequences in samples (median=57, IQR=16–175), representing a median of 57.1 % of the sequences found in negative controls (IQR=40.80–67.50) and a median of 0.07% of the sequences found in samples (IQR=0.02–0.27). There were only two samples with a higher proportion of contaminant sequences: 33% of sequences were assigned to contaminant *Phyllobacterium* (OUT 24) in one sample, while 13 % of sequences were assigned to contaminant *Pseudomonas* (OTU 66) in another sample (Fig. S1).

Finally, 602 OTUs accounting for 11 696 096 sequences among samples included in the study (median=73 553, IQR: 55 974–95 915) were considered for downstream analyses. A summary of the number of OTUs and sequences obtained at each clean-up step can be found in Table S1.

Alpha-diversity analysis enabled the characterization of groups in terms of bacterial species richness and diversity. IPD cases (Chao1 median=45.7, IQR=33.6–61.9/Shannon median=0.83, IQR=0.37–1.19) and URTI controls (median Chao1=47.5, IQR=31.6–75.7/Shannon median=0.92, IQR=0.49–1.31) presented lower richness and diversity values in comparison to healthy/asymptomatic controls (Chao1 median=55.1, IQR=42.6–78.4/

median Shannon=1.11, IQR=0.70–1.50). Despite the trends being observed, such differences did not achieve statistical significance (Fig. 2a). Besides the groups of study, children with  $\geq 1$  dose of PCV were associated with a more diverse microbiota as measured by Shannon index (median=1.11, IQR=0.56–1.56) when compared to non-vaccinated children (median=0.74, IQR=0.46–1.08) (Fig. 2b). However, a complex interaction existed between vaccination status and study groups [permutational analysis of covariance (ANCOVA);  $P=0.03$ ]; such differences of diversity according to vaccination status were mainly observed among IPD and URTI control groups. Virally infected children were associated with lower Shannon diversity values (median=0.93, IQR=0.48–1.31) in comparison to those non-infected (median=1.32, IQR=0.73–1.66) (Fig. 2c). Age, gender, breastfeeding duration according to WHO recommendations and sequencing run were non-determinant variables for bacterial Chao1 richness or Shannon diversity (Fig. S2).

Beta-diversity analyses revealed differences in nasopharyngeal microbiota composition of children according to respiratory health status using a Bray–Curtis (PERMANOVA  $R^2=3.6\%$ ,  $P=0.01$ ; PERMDISP  $P=0.63$ ) dissimilarity matrix (Fig. S3). *Post hoc* comparisons showed that IPD cases and healthy controls presented the most dissimilar microbiota profiles ( $R^2=3.8\%$ ,  $P=0.04$ ). A trend for significance in profile composition was observed for healthy and viral URTI controls ( $R^2=2.0\%$ ,  $P=0.08$ ), as well as for IPD cases and viral URTI controls ( $R^2=2.5\%$ ,  $P=0.11$ ). Additionally, microbiota composition was influenced by breastfeeding  $\geq 6$  months ( $R^2=2.2\%$ ,  $P=0.02$ ), vaccination status ( $R^2=2.7\%$ ,  $P=0.007$ ), viral infection ( $R^2=3.4\%$ ,  $P=0.003$ ) and nasopharyngeal pneumococcal load ( $R^2=3.7\%$ ,  $P=0.002$ ) (Fig. S3). Neither age nor gender nor sequencing run were related to relevant modifications of beta-diversity (Fig. S3). Further analyses with Jaccard and weighted Unifrac measures corroborated these results (Figs S4 and S5), and went even further by demonstrating deeper differences on microbiota composition between IPD and URTI groups when using a phylogenetic-based distance as the latter ( $R^2=4.5\%$ ,  $P=0.03$ ; Fig. S5).

CCA assessed the relevance and relation of these variables influencing beta-diversity with the nasopharyngeal microbiota composition (Fig. 3). The total inertia of the CCA model was 1.33, of which 0.16 corresponded to constrained inertia. The CCA corroborated that a proportion of the constrained variance observed in the bacterial communities was driven by the significant variables influencing beta-diversity (CCA model,  $P=0.001$ ). The axis CCA1 ( $P=0.001$ ), CCA2 ( $P=0.007$ ) and CCA3 ( $P=0.04$ ) were the main axes capturing a significant proportion of constrained variation (14.1%). The results indicated that IPD cases ( $P=0.01$ ), higher pneumococcal loads ( $P=0.001$ ) and viral infections ( $P=0.001$ ) were the most important factors shaping the structure of microbial communities in this study, as denoted by the exhibition of the longest arrows. It can be observed that *Streptococcus* falls close to the vector of IPD group and pneumococcal load, indicating potential strong

**Table 1.** Characteristics of the study groups

Parameter	IPD group (n=27)	URTI control group (n=48)	Healthy control group (n=65)	Global P value <sup>a</sup>	IPD – URTI <sup>a</sup>	IPD – healthy	URTI – healthy
<b>Demographic and epidemiological parameters</b>							
Median age, months (IQR)	33 (19.0–49.5)	24.5 (14.7–45.0)	31 (19.0–43.0)	0.85	–	–	–
Gender, female (%)	15/27 (55.6)	24/48 (50.0)	28/65 (43.1)	0.53	–	–	–
Mean birth weight, g (sd) <sup>b</sup>	3259.6 (506.9)	3108.7 (538.1)	3296.7 (521.2)	0.26	–	–	–
Median gestational age, weeks (IQR) <sup>c</sup>	40 (38.2–40.4)	39.3 (38.0–40.0)	40 (39.0–40.0)	0.32	–	–	–
Median house surface per inhabitant, m <sup>2</sup> (IQR) <sup>d</sup>	20 (18.1–28.3)	20 (17.1–23.3)	22.5 (18.1–26.7)	0.38	–	–	–
Seasonality, samples collected during viral season (%) <sup>i</sup>	17/27 (63.0)	27/48 (56.3)	30/65 (46.1 %)	0.29	–	–	–
Ethnicity, white (%) <sup>j</sup>	16/24 (66.7)	24/48 (50.0)	55/64 (85.9)	<0.001***	0.27	0.16	<0.001***
Delivery mode, C-section (%)	6/23 (26.1)	15/48 (31.2)	20/62 (32.2)	0.86	–	–	–
Breastfeeding (%)	23/26 (88.5)	38/48 (79.2)	49/65 (75.4)	0.40	–	–	–
Median breastfeeding duration, months (IQR) <sup>e</sup>	6.5 (1.6–12.0)	6.0 (1.7–12.0)	6.0 (1.0–18.0)	0.98	–	–	–
Breastfeeding duration ≥6 months (%)	14/26 (53.8)	29/48 (60.4)	33/65 (50.8)	0.47	–	–	–
Kindergarten attendance (%)	15/26 (57.7)	31/47 (65.9)	19/65 (29.2)	0.002**	0.36	0.08(,)	<0.001***
Schooled (%)	21/26 (80.8)	36/47 (76.6)	43/65 (66.1)	0.26	–	–	–
Household members under 5 years (%)	9/25 (36.0)	20/46 (43.5)	15/60 (25.0)	0.13	–	–	–
Smoking habits in the household (%)	8/26 (30.8)	15/48 (31.2)	36/64 (56.2)	0.02*	1.00	0.08(,)	0.04*
Educational level, basic (%)	3/19 (15.8)	9/47 (19.1)	6/57 (10.5)	0.49	–	–	–
≥1 dose of PCV (%)	15/27 (55.5)	34/48 (70.8)	49/65 (75.4)	0.17	–	–	–
Gastroenteritis in the previous month (%)	9/25 (36.0)	5/48 (10.4)	6/62 (9.7)	0.003**	0.04*	0.03*	1.00
<b>Analytical and blood parameters</b>							
Blood test – median haemoglobin, g dl <sup>-1</sup> (IQR) <sup>f</sup>	10.7 (10.1–11.7)	12.1 (11.7–12.6)	12.5 (11.9–13.1)	<0.001***	0.09(,)	<0.001***	0.41
Blood test – median leucocytes, thousandmm <sup>-3</sup> (IQR)	16.5 (10.7–19.8)	5.7 (5.1–8.6)	9.0 (6.4–10.0)	<0.001***	<0.01**	<0.001***	0.17
<b>Microbiological parameters</b>							
NP pneumococcal carriage (%)	27/27 (100)	25/48 (52.1)	40/64 (62.5)	<0.001***	<0.001*** <sup>h</sup>	<0.01*** <sup>h</sup>	0.36 <sup>h</sup>
Median NP pneumococcal load, log <sub>10</sub> copies ml <sup>-1</sup> (IQR) <sup>g</sup>	6.33 (5.3–6.7)	3.53 (0–6.1)	4.45 (0–6.1)	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***
NP pneumococcal serotype covered by PCV13 vaccination (%)	14/27 (51.8)	4/25 (16.0)	5/40 (12.5)	0.001*** <sup>h</sup>	0.02* <sup>h</sup>	<0.01*** <sup>h</sup>	0.73 <sup>h</sup>
NP pneumococcal serotype with high invasive disease potential (%)	14/27 (51.8)	0/25 (0.0)	4/40 (10.0)	<0.001*** <sup>h</sup>	<0.001*** <sup>h</sup>	<0.001*** <sup>h</sup>	0.15 <sup>h</sup>

Continued

Table 1. Continued

Parameter	IPD group (n=27)	URTI control group (n=48)	Healthy control group (n=65)	Global P value <sup>a</sup>	IPD – URTI <sup>a</sup>	IPD – healthy	URTI – healthy
DNA/RNA viral detection by multiplex PCR (%) <sup>k</sup>	22/27 (81.5)	48/48 (100)	39/65 (60.0)	–	–	<b>0.05<sup>ah</sup></b>	–
DNA/RNA viral detection >2 viruses by multiplex PCR (%) <sup>k</sup>	9/27 (33.3)	28/48 (58.3)	10/65 (15.4)	–	–	0.10(.)	–
Human rhinovirus/enterovirus (%) <sup>k</sup>	16/27 (59.2)	27/48 (56.2)	27/65 (41.5)	–	–	0.19	–
Human adenovirus (%) <sup>k</sup>	3/27 (11.1)	15/48 (31.2)	7/65 (10.8)	–	–	1.00 <sup>b</sup>	–
Human bocavirus (%) <sup>k</sup>	4/25 (16.0)	12/48 (25.0)	3/65 (4.6)	–	–	0.09(.) <sup>b</sup>	–
Human coronaviruses NL63, OC43, 229E (%) <sup>k</sup>	2/27 (7.4)	6/48 (12.5)	5/65 (7.7)	–	–	1.00 <sup>b</sup>	–
Human influenza A virus (%) <sup>k</sup>	1/26 (3.8)	3/48 (6.2)	0/65 (0.0)	–	–	0.29 <sup>b</sup>	–
Human influenza B virus (%) <sup>k</sup>	2/26 (7.7)	3/48 (6.2)	2/65 (3.1)	–	–	0.32 <sup>b</sup>	–
Human influenza A and B virus (%) <sup>k</sup>	3/26 (11.5)	6/48 (12.5)	2/65 (3.1)	–	–	0.14 <sup>b</sup>	–
Human parainfluenza 1 virus (%) <sup>k</sup>	0/27 (0.0)	4/48 (8.3)	0/65 (0.0)	–	–	–	–
Human parainfluenza 3 virus (%) <sup>k</sup>	1/27 (3.7)	5/48 (10.4)	1/65 (1.5)	–	–	0.50 <sup>b</sup>	–
Human parainfluenza 4 virus (%) <sup>k</sup>	0/27 (0.0)	0/48 (0.0)	3/65 (4.6)	–	–	0.55 <sup>b</sup>	–
Human parainfluenza 1,3,4 viruses (%) <sup>k</sup>	1/27 (3.7)	9/48 (18.7)	4/65 (6.1)	–	–	1.00	–
Human respiratory syncytial virus A and B (%) <sup>k</sup>	4/26 (15.4)	4/48 (8.3)	2/65 (5.1)	–	–	<b>0.05<sup>ah</sup></b>	–
Human metapneumovirus (%) <sup>k</sup>	1/27 (3.7)	6/48 (12.5)	1/65 (1.5)	–	–	0.50 <sup>b</sup>	–

<sup>a</sup>ANOVA and Kruskal–Wallis tests were used for parametric and non-parametric continuous variables, respectively. Chi-square test was used for categorical variables. Specific group differences among quantitative variables were pointed out by *post hoc* Tukey HSD or pairwise Wilcoxon tests with Benjamin–Hochberg corrections for multiple testing in case of parametric and non-parametric variables, respectively. Pairwise Chi-squared tests were used for categorical variables.

<sup>b</sup>Comparisons performed on 25 IPD cases, 47 URTI controls and 65 healthy controls.

<sup>c</sup>Comparisons performed on 26 IPD cases, 47 URTI controls and 65 healthy controls.

<sup>d</sup>Comparisons performed on 23 IPD cases, 44 URTI controls and 62 healthy controls.

<sup>e</sup>Comparisons performed on 26 IPD cases, 48 URTI controls and 62 healthy controls.

<sup>f</sup>Comparisons performed on 25 IPD cases, 6 URTI controls and 41 healthy controls.

<sup>g</sup>Comparisons performed on 27 IPD cases, 48 URTI controls and 64 healthy controls. Subjects with negative PCR were assumed to present 0 pneumococcal genome copies/ml<sup>-1</sup>. A sum of a small pseudocount (value +1) was applied to this variable prior to log<sub>10</sub> transformation.

<sup>h</sup>Fisher exact test and pairwise Fisher exact test were performed for categorical variables instead of Chi-square tests in case of ≥25% of cells presented expected frequencies ≤5.

<sup>i</sup>Viral season was defined as the period of time corresponding to influenza A and RSV circulation over the basal levels according to the Surveillance Plan of ARIs in Catalonia (PIDIRAC) (<https://canalsalut.gencat.cat/ca/professionals/vigilancia-epidemiologica/pla-dinformacio-de-les-infeccions-respiratorias-agudes-a-catalunya-pidirac/>) and reports from the Hospital Surveillance Network for RSV in Catalonia (Vall d'Hebrón Hospital) (<https://hospital.vallhebron.com/ca/actualitat/publicacions/informe-xarxa-de-vigilancia-hospitalaria-de-vrs/>).

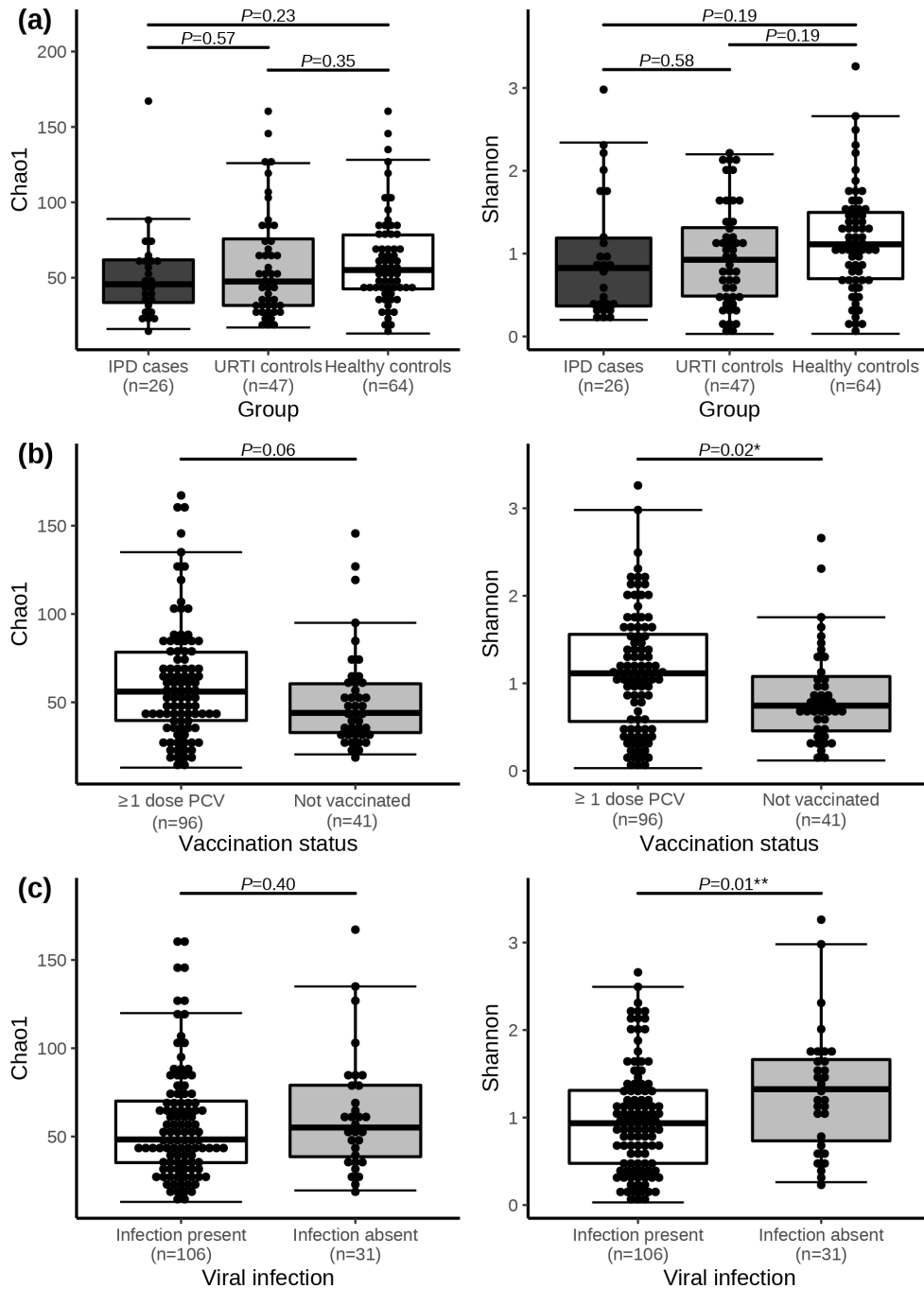
<sup>j</sup>The white group included individuals of European origin, while non-white referred to African, African American, Asian, Latin American and mixed ethnic groups.

<sup>k</sup>P values reporting significance for comparisons between healthy and IPD groups. URTI control group was not considered.

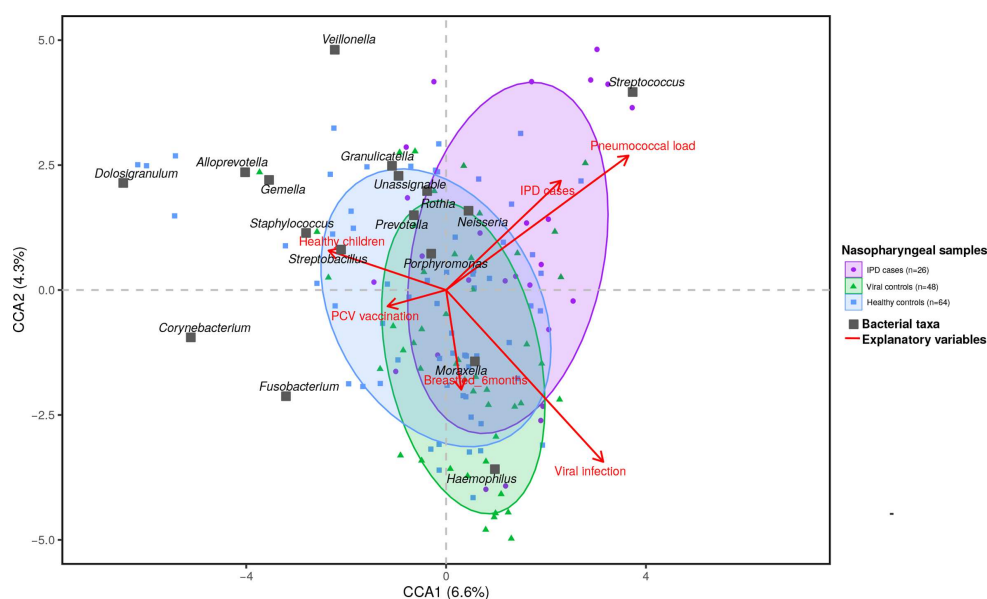
Significance values: \*\*\*≤0.001, \*\*≤0.01, \*≤0.05, (.)≤0.1 (trend).

NP, Nasopharyngeal; RSV, Respiratory Syncytial Virus.





**Fig. 2.** Comparison of Chao1 richness and Shannon diversity indexes. Boxplots with median and IQR are used for representing Chao1 richness and Shannon diversity values of nasopharyngeal samples according to respiratory health status (a), vaccination status (b) and viral infection (c). P-values of significance asterix-tagged depending on strength of significance: \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$  and \* $P \leq 0.05$ .



**Fig. 3.** Triplot of CCA showing distribution of nasopharyngeal samples with reference to bacterial genera and explanatory variables. Nasopharyngeal samples are represented by purple dots, green triangles and blue squares corresponding to nasopharyngeal samples from IPD children, children with self-limiting viral infections and healthy children, respectively. For clarity, ellipses are drawn containing 75% of nasopharyngeal samples from each study group and coloured accordingly. The red arrows indicate the direction and strength (length) of the explanatory variables. The dark grey squares correspond to the peaks of higher abundance of each bacterial genus. Genera labels are written next to the squares. *P* value refers to the overall significance of the model.

positive associations. However, *Haemophilus* was associated with the vector of viral infections (Fig. 3). Inclusion in the healthy/asymptomatic control group ( $P=0.02$ ) or PCV13 vaccination ( $P=0.005$ ) were pointing to a cluster of taxa represented by *Dolosigranulum*, *Corynebacterium* and a series of oral bacteria. Also to be noted, *Moraxella* was relatively close to breastfeeding  $\geq 6$  months ( $P=0.02$ ) (Fig. 3).

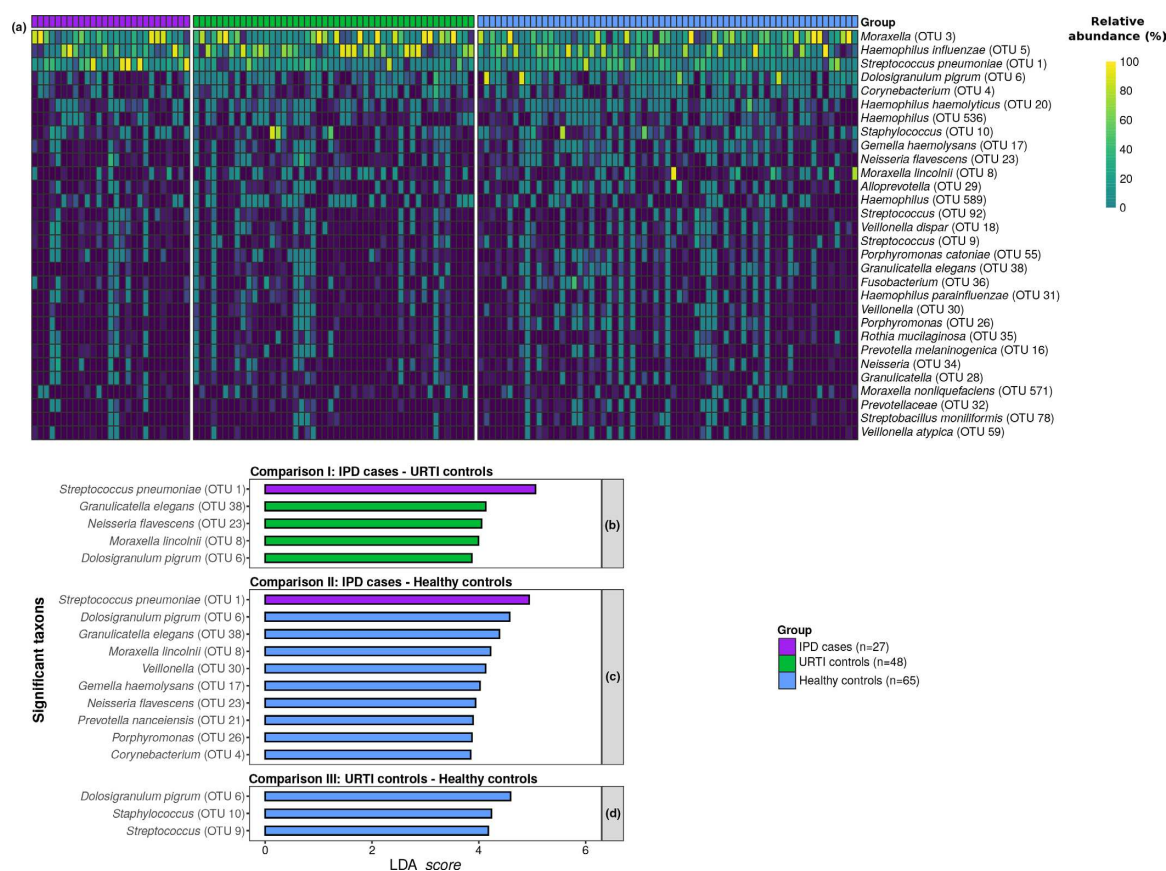
#### Identification of bacterial biomarkers associated with respiratory health status and environmental factors

The most abundant genera were *Moraxella*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Dolosigranulum*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Veillonella* and *Neisseria*, with median relative abundances of 24.60, 15.00, 8.50, 0.26, 0.06, 0.02, 0.02 and 0.02%, respectively. However, their distribution varied according to respiratory health status: *Streptococcus* (26.30%), *Haemophilus* (22.82%) and *Moraxella* (27.58%) were the most abundant genera in IPD cases, viral URTI controls and healthy/asymptomatic controls, respectively. At a deeper taxonomic level, the most abundant taxa in each group corresponded to *S. pneumoniae* (OTU 1; 19.99%), *H. influenzae* (OTU 5; 19.61%) and *Moraxella* (OTU 3; 21.02%), respectively. All OTUs and genera detected by

group, together with their median relative abundances, are shown in Tables S2 and S3.

Differential distribution analyses with LEfSe identified *S. pneumoniae* (OTU 1) as the main taxon overrepresented in the nasopharyngeal microbiota of children with IPD (Fig. 4a–c). However, control groups presented a significantly higher abundance of different bacteria. *Dolosigranulum pigrum* (OTU 6) (Fig. 4b, c) was associated with controls, and healthy children exhibited the highest abundance levels of this bacterium (Fig. 4c, d). *Moraxella lincolnii* (OTU 8), *Neisseria flavescens* (OTU 23) and *Granulicatella elegans* (OTU 38) were also associated with both control groups (Fig. 4b, c). In turn, the nasopharyngeal microbiota of healthy/asymptomatic children was enriched in *Corynebacterium* (OTU 4) and several taxa commonly found in the oral niche, such as *Veillonella* (OTU 30), *Gemella haemolysans* (OTU 17) and *Prevotella nanceiensis* (OTU 21), when compared to IPD (Fig. 4c). Consistent results were found at the genus level (Fig. S6).

LEfSe also corroborated the association of bacterial genera from the oral cavity, such as *Alloprevotella*, *Porphyromonas*, *Veillonella*, *Gemella* and *Granulicatella*, with children who received at least one dose of PCV. *Haemophilus* was overrepresented in the group of children with viral infections, while *Dolosigranulum*, *Corynebacterium* or *Gemella* were



**Fig. 4.** Relative abundance of OTUs according to respiratory health status. (a) Relative abundance heatmap of specific OTUs across samples. Samples belonging to the same group were put together in the x axis. OTUs were ordered according to their median relative abundance values. (b–d) In addition, LefSe identified bacterial OTUs with statistically significant differences in their relative abundance between IPD cases and viral URTI controls (b), IPD cases and healthy controls (c), and between both control groups (d).

significantly less abundant in this group. No specific bacterial genus was associated with maternal breastfeeding duration  $\geq 6$  months (Fig. S7).

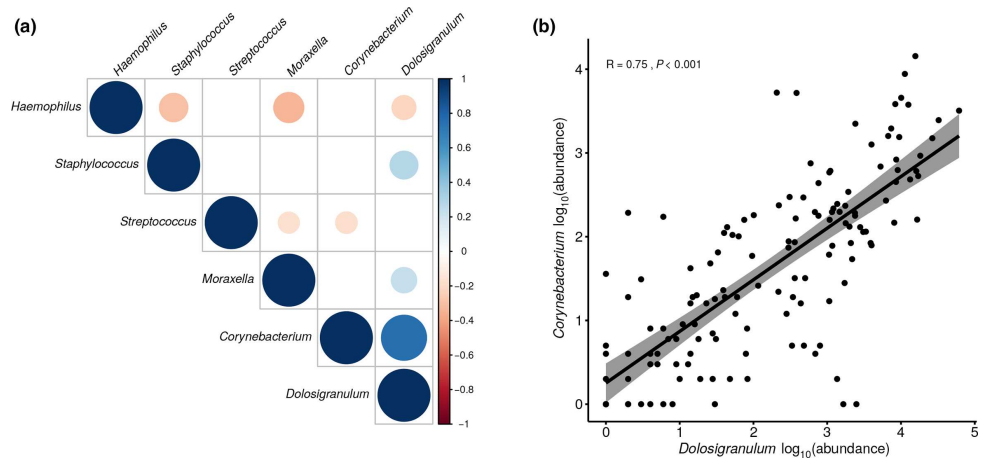
### Bacterial correlations

Spearman's correlations revealed significant interrelations between the dominant bacteria of the nasopharyngeal microbiota (Fig. 5a). *Streptococcus* was found to be negatively associated with *Corynebacterium* and *Moraxella*. The latter correlation was mainly due to negative associations between *M. lincolnii* (OTU 8) and *S. pneumoniae* (OTU 1) (Table S4). The genus *Haemophilus* was inversely correlated to the presence of *Dolosigranulum*, *Moraxella* and *Staphylococcus*. Positive correlations were detected as well between *Dolosigranulum* and *Moraxella*. However, the strongest correlation corresponded to that of *Dolosigranulum* with *Corynebacterium*, displaying a high lineal relation with coefficient of 0.75 % ( $P < 0.001$ ) (Fig. 5b). Significant and

non-significant bacterial interrelations are shown in Tables S4 and S5 at OTU and genus level.

### Case-control classification using RF classifier

RF models showed good performance in discriminating cases from controls by combining only microbiological parameters assessed on nasopharyngeal samples. Receiver operating characteristic (ROC) curves of the models showed AUCs of 0.90 [95% confidence interval (CI): 0.83–0.97], 0.86 (95% CI: 0.78–0.94) and 0.86 (95% CI: 0.78–0.93) for model I (IPD cases versus viral URTI controls), model II (IPD cases versus healthy/asymptomatic controls) and model III (IPD cases versus all controls), respectively (Fig. 6a). Important predictors related to IPD were pneumococcal colonization (essentially colonization by serotypes with high invasive disease potential and/or serotypes covered by PCV13 vaccination), high nasopharyngeal pneumococcal load quantified

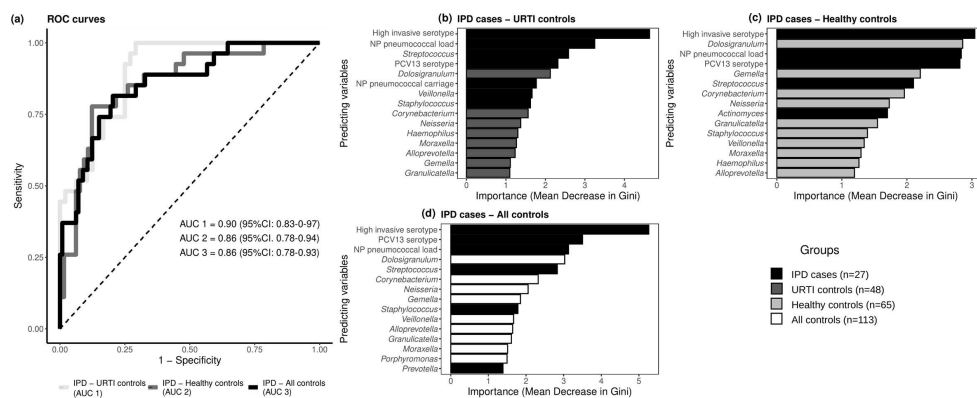


**Fig. 5.** Bacterial genera correlations. A Spearman's correlation matrix between dominant genera detected in nasopharyngeal samples is shown in (a). Only significant correlations are shown ( $P < 0.05$ ). (b) A scatter plot of the Spearman's correlation between two specific genera: *Dolosigranulum* and *Corynebacterium*.

by quantitative real-time PCR and high abundance of the genus *Streptococcus* as determined by 16S rRNA gene sequencing (Fig. 6b, c, d). In turn, the most important predictor associated with controls was a high abundance of *Dolosigranulum*, followed by a high abundance of other genera such as *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Gemella* and others (Fig. 6d). Nasopharyngeal pneumococcal colonization (independently of the serotype detected) was considered important for classification in model I (IPD vs viral URTI) (Fig. 6b). Very similar results were obtained at the OTU level (Fig. S8).

## DISCUSSION

This study unveiled significant differences in nasopharyngeal microbiota structure according to respiratory health status, and identified a number of bacterial species potentially protective against IPD. Alpha-diversity analyses showed the highest species richness and diversity levels associated with the healthy control group, despite no statistical significance being obtained. There is a widely accepted idea that loss of microbial diversity is associated with human disease, while a healthy resilient microbiota relies on high richness and



**Fig. 6.** Performance of RF classifier models. RF models were utilized for distinguishing (i) IPD cases from URTI controls, (ii) IPD cases from healthy controls, and (iii) IPD cases from all controls using pneumococcal and viral parameters as well as microbiota abundance values of OTUs. Comparison of the ROC curves of the different models is shown in (a). In addition, the contribution of the variables to the performance of the three models is shown in (b, c, d), through the representation of the mean decrease in Gini index of each variable.

biodiversity [8]. However, the present results may contradict in part the results of our previous study showing a highly diverse nasopharyngeal microbiota associated with IPD [24]. Differences between diversity patterns linked to IPD or health in our two studies may be explained by distinct study designs; while the previous study included patients exposed to  $\beta$ -lactam antibiotic treatment during a mean period of 4 days, this current study was exclusively performed with patients exposed  $\leq 24$  h to antibiotics. A longitudinal study performed on children with cystic fibrosis supports our hypothesis by demonstrating a transient increase of diversity at 3 days of  $\beta$ -lactam antibiotic therapy that normalizes at day 8–10 [47].

A healthy microbiota profile was further characterized as mainly dominated by *Moraxella* and overrepresentation of *D. pigrum*, *M. lincolnii*, *Corynebacterium* and a great variety of bacterial species typically found in the oral cavity [48]. This is in line with a previous study by our group that found a lower prevalence of IPD cases among the nasopharyngeal-type dominated by *D. pigrum*. *D. pigrum* belongs to the group of lactic acid bacteria (LAB), which produce lactate as the main metabolite of glucose [49]. LAB play numerous beneficial functions in the gut; inhibition of overgrowth of pathogenic micro-organisms, degradation of mycotoxins or stimulation of the immune system, among others [50]. The results from the present study confirm that *D. pigrum* is enriched in the nasopharynx of healthy children, suggesting that *D. pigrum* could carry out similar functions in the respiratory microbiome, in combination with other beneficial bacteria like *Corynebacterium*. In this regard, we noted a highly positive correlation between the two bacterial species as well as negative associations with main bacterial pathobionts. This finding may indicate that both species could act together to contain pathogenic outgrowth and is aligned with results from Brugger *et al.*, reporting that inhibition of *S. pneumoniae* by *D. pigrum* requires the presence of *Corynebacterium* [51]. Other studies have also documented the presence of both *Dolosigranulum* and *Corynebacterium* in healthy phenotypes [7, 16, 52]. Such a close relationship may be explained in part by the acidification of the surrounding environment with lactate produced by *D. pigrum*, which is favourable for *Corynebacterium* [4]. The higher frequency of *Veillonella* in healthy children compared to IPD cases also supports the existence of a lactate-rich environment, given that this bacterium utilizes lactate as a carbon source [53]. The role of *Moraxella* in respiratory health is more controversial: although several studies consistently report that *Moraxella* enrichment is linked to increased susceptibility and severity in ARIs [13, 22, 23, 54], others describe high *Moraxella* abundances associated with health and less severe manifestations of respiratory infections [9, 21, 55]. These conflicting results may derive from the distinct *Moraxella* species detected across studies, most of them not achieving species level taxonomic resolution. In fact, it has been described that by the age of 6 months, two distinct *Moraxella*-dominated microbiota profiles exist: one highly suggestive of *Moraxella*

*catarrhalis* and the other corresponding to a *M. lincolnii* species [9]. While the former has been typically related to ARI episodes, the latter is a typical commensal bacterium from the URT whose relationship with respiratory health is not clear [10, 54]. To our knowledge, there is only one study reporting *M. lincolnii* as a protective bacterium against recurrent acute otitis media [16] and our results corroborate its association to healthy phenotypes.

The origin of potentially beneficial bacteria remains uncertain, some studies pointing to human milk [11, 56]. In this respect, we found that a longer duration of maternal breastfeeding was associated with significant changes of microbiota structure, but we were not able to demonstrate a significant enrichment of potentially beneficial bacteria in children breastfed for at least 6 months. Instead, we found decreased abundances of several anaerobic bacteria, including *Alloprevotella*, *Veillonella* and *Porphyromonas*, similarly to that which occurred in children breastfed for 6 weeks [11] or breastfed for 3 months [57]. Although they are generally considered as commensal bacteria of the oral cavity, these bacteria in conjunction with other bacterial pathogens, such as *S. pneumoniae*, *H. influenzae* or *Mycoplasma pneumoniae*, may play an important role in respiratory infections [58]. In addition to maternal breastfeeding, vaccination strategies have also been related to beneficial effects through the modulation of commensal microbiota from the URT. In our study, pneumococcal vaccination with  $\geq 1$  dose was significantly associated with a highly diverse microbiota structure, including micro-organisms typically found as oral commensals. It is plausible that the empty nasopharyngeal niche left by *S. pneumoniae* removal may be occupied by micro-organisms from the surrounding environment, including the oral cavity [45]. The blp-like streptococcal bacteriocins, for example, are known to be active against many oral organisms [59], and many nutritional and antagonistic interactions have been found between streptococci and other oral bacteria [60]. Although exploratory analyses have been performed in this study, future research specifically designed to study the effect of vaccination on nasopharyngeal microbiota composition should further explore this topic, given the complex relations and interactions established between vaccination and respiratory health status.

We characterized a nasopharyngeal microbiota profile dominated by *Streptococcus* and displaying a low number of taxa that was associated with IPD. Differential abundance testing and specific pneumococcal PCR confirmed enrichment of *S. pneumoniae*, highlighting a direct expectable relation of this pathobiont with the disease. However, the role of *S. pneumoniae* transcends a specific infection, and has been associated with increased susceptibility and severity to multiple respiratory diseases of different aetiology [21, 22, 61–64]. In this study, such enrichment coexisted with the underrepresentation of potential beneficial bacteria, an event that has been observed in longitudinal studies before and during ARIs [65], and an increased rate of viral infection among IPD cases in comparison to healthy

children. Direct viral–bacterial interactions implicated in the pathogenesis of respiratory infections have already been described [4]. The mechanism by which viruses enhance the occurrence of serious bacterial infections and potentially drive symptoms' severity is still far from being understood. It is believed that viral species reduce ecological biodiversity, promoting an imbalanced state of the nasopharyngeal microbiota, which facilitates pathogenic bacteria invasion [66]. However, others postulate that loss of microbial biodiversity is by itself a predisposing factor for viral acquisition [66]. Of particular note, we found that viral infection is an important factor that modulates bacterial diversity, but does not determine serious bacterial infection by itself. In this regard, the viral URTI control group was not associated with clinically relevant phenotypes, despite exhibiting an *Haemophilus*-dominated microbiota commonly related to increased susceptibility to and severity of viral ARIs [13, 22, 61, 62]. We speculate that the self-limiting course of viral infections observed in the viral URTI group may be explained by the maintenance of a relatively balanced microbiota with intermediate microbial composition between healthy and IPD groups, as demonstrated by beta-diversity analyses. This specific microbiota composition could counteract the triggering effect of concurring pathogenic bacteria and viruses maintaining a localized infection. Our hypothesis is also supported by the presence of potential beneficial commensals such as *D. pigrum* and *M. lincolnii* in the microbiota compositions characterized among controls with viral URTI. Altogether, these data suggest that a complete dysbiosis has not yet been produced in this specific group. Retaining some beneficial species could be key for preserving certain ecological homeostasis when microbiota disturbances are produced. Further evidence is provided by other studies that have reported gradual changes in nasopharyngeal microbiota composition according to disease severity [52, 61].

Integration of nasopharyngeal microbiological parameters into multivariate classification models, including microbiota species abundance, enabled accurate differential diagnosis of IPD cases, whose main clinical manifestation was pneumonia in up to 85% of cases. This finding is especially relevant, since the WHO defines pneumonia and subsequent treatments solely based on clinical signs and symptoms because the aetiological diagnosis is only achieved in a low number of pneumonia cases [67, 68]. Moreover, aetiological studies of pneumococcal pneumonia or pneumonia frequently caused by other bacterial pathogens in children are especially challenging due to the difficulty in obtaining adequate sputum specimens for differentiating colonization from infection. For this reason, microbiological confirmation of infection relies on the collection of invasive samples causing patient inconvenience and reluctance [69]. Our results suggest the potential of using URT samples for pneumococcal detection and quantification, which could contribute to differential diagnosis of IPD even in populations with high colonization rates. Higher pneumococcal loads and pneumococcal carriage rates of

100% were found in IPD cases, supporting the idea that colonization and overgrowth may be prior steps before invasive disease occurrence [5]. Similarly, diverse evidence has unveiled the contribution of ecosystems dysbiosis to the pathogenesis of respiratory infections and respiratory diseases with a chronic inflammatory character in children, such as asthma, bronchiolitis or cystic fibrosis. In such dysbiotic states, pathogenic bacteria are enriched, while other beneficial bacteria are underrepresented [4, 63]. Our findings point to the same direction, not only pneumococcal parameters related to pathogenic outgrowth were predictors of disease but also the lower abundance of commensal bacteria. Of note, discrimination between IPD cases and viral URTI controls on the basis of nasopharyngeal microbiota characteristics is in agreement with previous studies that have highlighted the potential of microbiota analyses for clinical diagnosis of infectious diseases [70, 71]. The first 72 h from episode onset are especially challenging for the differential diagnosis of potentially life-threatening bacterial infections from banal viral infections due to the overlap in the presentation of symptoms. Moreover, in recent years, technological advances have allowed integration of 16S rRNA gene sequencing analysis into small, portable, fast, low-cost and easy-to-use sequencing devices [72]. In this context, microbiota-based diagnostics hold promise for early aetiological diagnosis and specific antimicrobial treatment of ARIs at the point of need; thus, positively effecting mortality and antimicrobial resistance reduction [73, 74].

This study presents several limitations. As a consequence of the case–control design that we adopted, adequate for an exploratory study, only associations could be drawn from outcomes, without establishing causality. In addition, a small sample size was analysed due to a strict selection of cases exposed  $\leq 24$  h to antibiotics, which may have reduced the statistical power for detection of smaller but real effects of respiratory health status on alpha-diversity measures. In contrast, we consider that this stringent selection criterion has enabled better characterization of microbiota compositions without the bias of antibiotic effect. However, the consideration of a single model of severe disease may limit the applicability of the results. Nevertheless, a recent study points out that developing bacterial infections have a common pathway, suggesting that the mechanism is the same independently of the clinical phenotype [21]. Lastly, species-level resolution by using short-read sequencing technologies remains a challenge for microbiota studies, being especially problematic for those sequences assigned to *Streptococcus* [75]. To minimize this limitation, we used accurate programs specifically designed for species-classification of 16S rRNA gene amplicons together with high confidence thresholds, as described in methodology [76]. Moreover, we performed a specific PCR targeting the *lytA* gene for detecting *S. pneumoniae* on nasopharyngeal samples, leading to the same results.

In conclusion, our results add new evidence of the close relation between the nasopharyngeal microbiota and human respiratory health. Potentially protective species

were enriched in controls, suggesting their implication in preventing LRTIs and systemic infections. In addition, initial evidence of the potential of microbiota-based diagnostics for differential diagnosis of severe ARIs using non-invasive samples is reported.

#### Funding information

This research work was funded in part by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and the Ministry of Science and Innovation, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (<http://www.isciii.es>). Research on Health Projects [project number PI16/00174, principal investigator C.M.-A.], Predoctoral Contract for Training in Research into Health (project number FI17/00248, recipient D.H.), Sant Joan de Deu Foundation (project number AFR2015, principal investigator C.M.-A.) (<http://www.fsjd.org/es>). D.H. also received a grant from Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (<https://www.seimc.org/>) for a research stay at Teagasc Food Research Centre in Cork, Ireland. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, nor preparation of the manuscript.

#### Acknowledgements

We thank the Teagasc Food Research Centre, in particular Dr Paul Cotter, for hosting the research stay of D.H. at the centre. We also thank Dr Cristina Esteve, Dr Juan Jose Garcia-Garcia, Dr Cristian Launes and Dr Daniel Penela for their contribution in taking care of patients and/or microbiological studies, and Dr Jose Yuste for pneumococcal serotyping.

#### Author contributions

Conception and design: C.M.-A., P.B. Funding: C.M.-A., D.H. Case-control recruitment and data collection: M.F.S., A.F.-L., S.H.-B., D.H. Microbiological characterization (experiments): D.H., A.P.-A. Bioinformatics analyses/statistical analyses: D.H., R.C.-R. Analyses and interpretation of results: D.H., P.B., R.C.-R., A.M. Coordination: C.M.-A., R.C.-R. Writing of the manuscript: D.H., P.B. Revision of the manuscript: D.H., P.B., M.F.S., A.F.-L., S.H.-B., A.P.-A., A.M., C.M.-A., R.C.-R.

#### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest

#### Ethical statement

This research was approved by the Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Deu (PIC 70-15 and PIC 137-16) and was conducted in compliance with all relevant ethical regulations: Helsinki Declaration of 1975 (revised in 2000) and the Spanish Organic Laws 15/1999 (December 13th) and 14/2007 (July 3rd) on data protection and biomedical research. All parents and/or legal guardians signed informed consent for children participating in the study.

#### References

1. WHO. Global Health Observatory | by category | number of deaths by region - acute lower respiratory infections. <http://apps.who.int/gho/data/view.main.CM1002015REG6-CH9?lang=en> [accessed 22 Nov 2020].
2. WHO. Global Health Observatory | by category | number of deaths (thousands) - data by WHO region. <https://apps.who.int/gho/data/view.main.CM1300N?lang=en> [accessed 22 Nov 2020].
3. Rogawski ET, Platts-Mills JA, Seidman JC, John S, Mahfuz M, et al. Use of antibiotics in children younger than two years in eight countries: a prospective cohort study. *Bull World Health Organ* 2017;95:49–61.
4. De Steenhuijsen Piters WAA, Sanders EAM, Bogaert D. The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015;370:20140294.
5. Obaro S, Adegbola R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 2002;51:98–104.
6. Balsells E, Dagan R, Yildirim I, Gounder PP, Steens A, et al. The relative invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* among children after PCV introduction: a systematic review and meta-analysis. *J Infect* 2018;77:368–378.
7. Bosch A, De Steenhuijsen Piters WAA, Van Houten MA, Chu M, Biesbroek G, et al. Maturation of the infant respiratory microbiota, environmental drivers, and health consequences. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:1582–1590.
8. Relman DA. The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutr Rev* 2012;70:S2–S9.
9. Biesbroek G, Tsvitvadze E, Sanders EAM, Montijn R, Veenhoven RH, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1283–1292.
10. Bosch A, Levin E, van Houten MA, Hasrat R, Kalkman G, et al. Development of upper respiratory tract microbiota in infancy is affected by mode of delivery. *EBioMedicine* 2016;9:336–345.
11. Biesbroek G, Bosch A, Wang X, Keijser B, Veenhoven RH, et al. The impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:298–308.
12. Mika M, Maurer J, Korten I, Allemann A, Aebi S, et al. Influence of the pneumococcal conjugate vaccines on the temporal variation of pneumococcal carriage and the nasal microbiota in healthy infants: a longitudinal analysis of a case-control study. *Microbiome* 2017;5:85.
13. Chonmaitree T, Jennings K, Golovko G, Khanipov K, Pimenova M, et al. Nasopharyngeal microbiota in infants and changes during viral upper respiratory tract infection and acute otitis media. *PLoS One* 2017;12:e0180630.
14. Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, et al. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med* 2017;23:314–326.
15. Salter SJ, Turner C, Watthanaworawit W, de Goffau MC, Wagner J, et al. A longitudinal study of the infant nasopharyngeal microbiota: the effects of age, illness and antibiotic use in a cohort of South East Asian children. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0005975.
16. Lappan R, Imbrogno K, Sikazwe C, Anderson D, Mok D, et al. A microbiome case-control study of recurrent acute otitis media identified potentially protective bacterial genera. *BMC Microbiol* 2018;18:13.
17. Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP, et al. Upper respiratory tract microbial communities, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:6262–6270.
18. Hanada S, Pirzadeh M, Carver KY, Deng JC. Respiratory viral infection-induced microbiome alterations and secondary bacterial pneumonia. *Front Immunol* 2018;9:2640.
19. Kaul D, Rathnasinghe R, Ferres M, Tan GS, Barrera A, et al. Microbiome disturbance and resilience dynamics of the upper respiratory tract during influenza A virus infection. *Nat Commun* 2020;11:2537.
20. van Houten CB, Cohen A, Engelhard D, Hays JP, Karlsson R, et al. Antibiotic misuse in respiratory tract infections in children and adults – a prospective, multicentre study (TAILORED Treatment). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:505–514.
21. Man WH, van Houten MA, Mérelle ME, Vlieger AM, Chu M, et al. Bacterial and viral respiratory tract microbiota and host characteristics in children with lower respiratory tract infections: a matched case-control study. *Lancet Respir Med* 2019;7:417–426.
22. Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serratha M, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* 2015;17:704–715.
23. Vissing NH, Chawes BLK, Bisgaard H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1246–1252.
24. Camelo-Castillo A, Henares D, Brotons P, Galiana A, Rodríguez JC, et al. Nasopharyngeal microbiota in children with invasive pneumococcal disease: identification of bacteria with potential disease-promoting and protective effects. *Front Microbiol* 2019;10:11.

25. Panda S, Khader E, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, et al. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One* 2014;9:e95476.
26. Ramsay M. Chapter 25 Pneumococcal. In: *The Green Book of Immunisation*. London: Public Health England, 2020.
27. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, et al. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis* 2003;187:1424–1432.
28. Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F, Diggle L, Gupta S, et al. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J Infect Dis* 2006;194:682–688.
29. del Amo E, Selva L, de Sevilla MF, Ciruela P, Brotons P, et al. Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:705–711.
30. CDC, NCIRD. Chapter 8 Identification and characterization of *Streptococcus pneumoniae*. In: *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2020. <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-identification-streppneumo.html>
31. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011;27:863–864.
32. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 2011;27:2957–2963.
33. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 2013;10:996–998.
34. 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;73:5261–5267.
35. Allard G, Ryan FJ, Jeffery IB, Claesson MJ. SPINGO: a rapid species-classifier for microbial amplicon sequences. *BMC Bioinformatics* 2015;16:324.
36. Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 2010;26:266–267.
37. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335–336.
38. Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 2018;6:226.
39. Vatanen T, Kostic AD, D’Hennezel E, Siljander H, Franzosa EA, et al. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. *Cell* 2016;165:842–853.
40. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* 2014;12:87.
41. Cao Q, Sun X, Rajesh K, Chalasani N, Gelow K, et al. Effects of rare microbiome taxa filtering on statistical analysis. *Front Microbiol* 2021;11:607325.
42. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018. <https://www.gbif.org/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing>
43. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, et al. Package ‘vegan’; Community ecology package. 2020. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
44. Ho Man W, De Steenhuijsen Piters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:259–270.
45. Biesbroek G, Wang X, Keijsers BJF, Eijkemans RMJ, Trzciński K, et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerg Infect Dis* 2014;20:201–210.
46. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;12:R60.
47. Smith DJ, Badrick AC, Zakrzewski M, Krause L, Bell SC, et al. Pyrosequencing reveals transient cystic fibrosis lung microbiome changes with intravenous antibiotics. *Eur Respir J* 2014;44:922–930.
48. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010;192:5002–5017.
49. Mokoena MP. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules* 2017;22:E1255.
50. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:503–514.
51. Brugger SD, Eslami SM, Pettigrew MM, Escapa IF, Henke MM, et al. *Dolosigranulum pigrum* cooperation and competition in human nasal microbiota. *bioRxiv* 2019:678698.
52. Kelly MS, Surette MG, Smieja M, Pernica JM, Rossi L, et al. The nasopharyngeal microbiota of children with respiratory infections in Botswana. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:e211–e218.
53. Mays TD, Holdeman LV, Moore WEC, Rogosa M, Johnson JL. Taxonomy of the genus *Veillonella* Prévot. *Int J Syst Bacteriol* 1982;32:28–36.
54. Sakwinska O, Schmid VB, Berger B, Bruttin A, Keitel K, et al. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. *J Clin Microbiol* 2014;52:1590–1594.
55. Hasegawa K, Linnemann RW, Mansbach JM, Ajami NJ, Espinola JA, et al. Nasal airway microbiota profile and severe bronchiolitis in infants: a case-control study. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:1044–1051.
56. Drago L, Toscano M, De Grandi R, Grossi E, Padovani EM, et al. Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi. *ISME J* 2017;11:875–884.
57. Holgerson PL, Vestman NR, Claesson R, Öhman C, Domellöf M, et al. Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;56:127–136.
58. Yamasaki K, Kawanami T, Yatera K, Fukuda K, Noguchi S, et al. Significance of anaerobes and oral bacteria in community-acquired pneumonia. *PLoS One* 2013;8:e63103.
59. Llena C, Almarche A, Mira A, López MA. Antimicrobial efficacy of the supernatant of *Streptococcus dentisani* against microorganisms implicated in root canal infections. *J Oral Sci* 2019;61:184–194.
60. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol* 2017;44:S12–S22.
61. De Steenhuijsen Piters WAA, Heinonen S, Hasrat R, Bunsow E, Smith B, et al. Nasopharyngeal microbiota, host transcriptome, and disease severity in children with respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:1104–1115.
62. Edouard S, Million M, Bachar D, Dubourg G, Michelle C, et al. The nasopharyngeal microbiota in patients with viral respiratory tract infections is enriched in bacterial pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018;37:1725–1733.
63. Lanaspá M, Bassat Q, Medeiros MM, Muñoz-Almagro C. Respiratory microbiota and lower respiratory tract disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017;15:703–711.
64. Huang YJ, Lynch SV. The emerging relationship between the airway microbiota and chronic respiratory disease: clinical implications. *Expert Rev Respir Med* 2011;5:809–821.
65. Man WH, Clerc M, De Steenhuijsen Piters WAA, van Houten MA, Chu M, et al. Loss of microbial topography between oral and nasopharyngeal microbiota and development of respiratory infections early in life. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;200:760–770.
66. Dubourg G, Edouard S, Raoult D. Relationship between nasopharyngeal microbiota and patient’s susceptibility to viral infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2019;17:437–447.
67. Harris M, Clark J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of



- community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax* 2011;66:iii1–ii23.
68. Wubbel L, Muniz L, Ahmed A, Trujillo M, Carubelli C, et al. Etiology and treatment of community-acquired pneumonia in ambulatory children. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:98–104.
  69. Rodrigues CMC, Groves H. Community-acquired pneumonia in children: the challenges of microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol* 2018;56:e01318–17.
  70. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2014;52:139–146.
  71. Graspentner S, Bohlmann MK, Gillmann K, Speer R, Kuenzel S, et al. Microbiota-based analysis reveals specific bacterial traits and a novel strategy for the diagnosis of infectious infertility. *PLoS One* 2018;13:e0191047.
  72. Kai S, Matsuo Y, Nakagawa S, Kryukov K, Matsukawa S, et al. Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION nanopore sequencer. *FEBS Open Bio* 2019;9:548–557.
  73. Houck PM, Bratzler DW, Nsa W, Ma A, Bartlett JG. Timing of antibiotic administration and outcomes for medicare patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 2004;164:637–644.
  74. Llor C, Bjerrum L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf* 2014;5:229–241.
  75. Edgar RC, Valencia A. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics* 2018;34:2371–2375.
  76. Escobar-Zepeda A, Godoy-Lozano EE, Raggi L, Segovia L, Merino E, et al. Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: defining standards for progressive metagenomics. *Sci Rep* 2018;8:12034.
  77. Henares Bonilla D, Brotons P, de Sevilla MF, Fernández-Lopez A, Hernández-Bou S, et al. Supplementary material. figshare. Online resource. 2021. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13280435.v2>

**Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal**

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

**Find out more and submit your article at [microbiologyresearch.org](https://microbiologyresearch.org).**



---

## Resumen segundo artículo

Estudio caso-control prospectivo en el que se incluyeron todos los casos de ENI <18 años admitidos en HSJD con confirmación microbiológica de la enfermedad, con recogida de muestra nasofaríngea en ausencia de tratamiento antibiótico o tratamiento antibiótico con duración hasta 24 horas, con ausencia de factores de riesgo de ENI y con consentimiento para participar en el estudio, durante el período entre enero de 2014 y diciembre de 2018.

El grupo de casos se pareó por frecuencia en edad, sexo y estacionalidad con dos grupos de controles; por un lado, se reclutaron controles atendidos en el servicio de urgencias pediátricas de HSJD con infección respiratoria viral banal confirmada microbiológicamente y que no requirieron ingreso hospitalario, y por otro lado, controles sanos reclutados en visitas de revisión del niño sano o en el laboratorio clínico de HSJD cuando atendieron para una extracción sanguínea previa a cirugía menor. Se excluyeron controles si presentaban tratamiento antibiótico previo.

Se recogió información clínica, inmunológica y epidemiológica de los sujetos incluidos en el estudio, incluyendo la duración de la lactancia materna y la vacunación con una o más dosis de vacunas neumocócicas conjugadas. Se extrajo una muestra de aspirado nasofaríngeo de cada individuo donde se realizó la detección y cuantificación de neumococo por PCR *lytA*, el tipado capsular mediante técnicas moleculares basadas en análisis automatizado de fragmentos fluorescentes y PCR múltiple, y la detección de dieciséis virus respiratorios utilizando un panel de PCR múltiple. Se realizó la secuenciación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S con la plataforma MiSeq de Illumina. Posteriormente se procesaron y analizaron las secuencias.

Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

- Durante el período de estudio se diagnosticaron un total de 168 casos de ENI, de los cuales 144 accedieron a participar en el estudio.
- Los pacientes que cumplieron criterios de inclusión fueron 32 (la mayoría de ellos descartados por exposición previa a antibióticos >24 horas) y finalmente en 27 la secuenciación fue óptima.
- Los casos de ENI se emparejaron por frecuencia con un grupo control sintomático con infección viral banal en el tracto respiratorio superior (n=48) y un grupo control sano o asintomático (n=65).

### ***Características epidemiológicas y clínicas de los casos de ENI***

- La mediana de edad de los casos fue de 33 meses (RI: 19.0–49.5 meses) y el 55.6% fueron mujeres (n=15).
- La principal manifestación clínica fue la neumonía (n=23), seguida de meningitis (n=3) y bacteriemia sin foco (n=1).
- La mediana de días de hospitalización fue de 11 días (RI: 8–15 días). El 14.8% de los casos requirió ingreso en UCI (n=4) y el 11.1% sufrió secuelas (n=3).

#### ***Características analíticas, epidemiológicas y microbiológicas en casos vs. controles***

- Los tres grupos presentaron características similares de edad, sexo y estacionalidad.
- Los casos de ENI estaban menos vacunados que los controles sintomáticos (55.5% vs. 70.8%,  $P=0.19$ ) y controles sanos (55.5% vs. 75.4%,  $P=0.07$ ). Aunque no fueron significativas, estas diferencias indican una tendencia.
- La tasa de portadores de neumococo fue más elevada en casos de ENI que en niños con infección respiratoria viral banal (100% vs. 52.1%,  $P<0.001$ ) y controles sanos (100.0% vs. 62.5%,  $P<0.01$ ).
- La carga de neumococo en nasofaringe fue más elevada en casos de ENI que en niños con infección respiratoria viral banal ( $6.3 \log_{10}$  copias/mL [RI: 5.3-6.7] vs.  $3.5 \log_{10}$  copias/mL [RI: 0-6.1],  $P<0.001$ ) y controles sanos ( $6.3 \log_{10}$  copias/mL [RI: 5.3-6.7] vs.  $4.4 \log_{10}$  copias/mL [RI: 0-6.1],  $P<0.001$ ).
- Los casos estaban más colonizados con serotipos vacunales que los controles con infección respiratoria viral banal (51.8% vs. 16.0%,  $P=0.02$ ) y controles sanos (51.8% vs. 12.5%,  $P<0.01$ ).
- Los casos estaban más colonizados con serotipos invasivos que los controles con infección respiratoria viral banal (51.8% vs. 0.0%,  $P<0.001$ ) y controles sanos (51.8% vs. 0.0%,  $P<0.001$ ).
- Una mayor proporción de casos de ENI presentaban infección viral en comparación con controles sanos (81.5% vs. 60.0%) ( $P=0.05$ ).

#### ***Análisis de diversidad alfa***

- Los casos de ENI (mediana Chao1=45.7, RI: 33.6-61.9) y controles con infección respiratoria viral banal (mediana Chao1=47.5, RI: 31.6-75.7) presentaron menor riqueza que los controles sanos (mediana Chao1=55.1, RI: 42.6-78.4).

- Los casos de ENI (mediana Shannon=0.83, RI: 0.37-1.19) y controles con infección respiratoria viral banal (mediana Shannon=0.92, RI: 0.49-1.31) presentaron menor diversidad que los controles sanos (mediana Shannon=1.11, RI: 0.70-1.50).
- Los niños con una o más dosis de vacunas neumocócicas conjugadas (mediana Shannon=1.11, RI: 0.56-1.56) presentaron mayor diversidad que los no vacunados (mediana Shannon=0.74, RI: 0.46-1.08) ( $P=0.02$ ).
- Los niños con infección viral, independientemente del estado de salud respiratoria, presentaron menor diversidad (mediana Shannon=0.93, RI: 0.48-1.31) que los niños sin infección (mediana Shannon=1.32, RI: 0.73-1.66) ( $P=0.01$ ).

#### **Análisis de diversidad beta**

- Los análisis de diversidad beta revelaron diferencias significativas de acuerdo con el estado de salud respiratoria ( $R^2=3.6\%$ ,  $P=0.01$ ).
- Los niños con ENI y controles sanos presentaron las composiciones de microbiota nasofaríngea más diferenciadas ( $R^2=3.8\%$ ,  $P=0.04$ ).
- Los controles sintomáticos con infección respiratoria viral banal presentaron una composición de microbiota nasofaríngea con características intermedias entre los casos de ENI ( $R^2=2.5\%$ ,  $P=0.11$ ) y controles sanos ( $R^2=2.0\%$ ,  $P=0.08$ ).
- La composición de microbiota nasofaríngea también se vio influenciada por la duración de la lactancia materna  $\geq 6$  meses ( $R^2=2.2\%$ ,  $P=0.02$ ), la vacunación con una o más dosis de VNC ( $R^2=2.7\%$ ,  $P=0.007$ ) y la infección viral ( $R^2=3.4$ ,  $P=0.003$ ).
- En el análisis de correlación canónica se incluyeron las variables de estado de salud respiratoria, duración de la lactancia materna  $\geq 6$  meses, vacunación con una o más dosis de VNC e infección viral y se confirmó que todas ellas contribuían a explicar significativamente la composición de microbiota nasofaríngea, así como también se determinó la relación de estas variables con los diferentes taxones (Modelo CCA  $P=0.001$ ).
  - El grupo de casos de ENI contribuía a modular la composición de microbiota nasofaríngea ( $P=0.01$ ) y se asoció con mayor abundancia del género *Streptococcus*.
  - El grupo de niños sanos ( $P=0.02$ ) y la vacunación con  $\geq 1$  dosis de VNC ( $P=0.005$ ) se relacionaron con una mayor abundancia de *Dolosigranulum*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Alloprevotella*, *Gemella* y otros géneros orales anaerobios.

- La infección viral ( $P=0.001$ ), independientemente del estado de salud respiratoria, se relacionó con una mayor abundancia del género *Haemophilus*, y la lactancia materna  $\geq 6$  meses ( $P=0.02$ ) con *Moraxella*.

#### **Análisis de abundancia diferencial**

- *Streptococcus pneumoniae* (OTU 1) se asoció a casos de ENI en comparación con ambos grupos de controles.
- Los controles sanos presentaron niveles más elevados de *Dolosigranulum pigrum* (OTU 6), *Granulicatella elegans* (OTU 38), *Moraxella lincolnii* (OTU 8), *Veillonella* (OTU 30), *Gemella haemolysans* (OTU 17), *Neisseria flavescens* (OTU 23), *Prevotella nanceiensis* (OTU 21), *Porphyromonas* (OTU 26) y *Corynebacterium* (OTU 4) en comparación con los casos de ENI.
- Los controles sintomáticos con infección respiratoria viral banal conservaban cierta abundancia de bacterias asociadas a niños sanos en comparación con ENI; *Granulicatella elegans* (OTU 38), *Neisseria flavescens* (OTU 23), *Moraxella lincolnii* (OTU 8) y *Dolosigranulum pigrum* (OTU 6).
- La abundancia de *Dolosigranulum pigrum* (OTU 6) decrecía significativamente conforme aumentaba la gravedad de los síntomas. Aunque no significativo, *Corynebacterium* (OTU 4) o *Neisseria flavescens* (OTU 23) también presentaron una abundancia inversamente proporcional a la gravedad de los síntomas.

#### **Correlaciones bacterianas de Spearman**

- El género *Streptococcus* presentó correlaciones negativas con *Corynebacterium* ( $\rho=-0.17$ ,  $P=0.04$ ) y *Moraxella* ( $\rho=-0.17$ ,  $P=0.05$ ). Esta última principalmente debido a la correlación entre *Streptococcus pneumoniae* (OTU 1) y *Moraxella lincolnii* (OTU 8) ( $\rho=-0.17$ ,  $P=0.04$ ).
- *Haemophilus* presentó correlaciones negativas con *Dolosigranulum* ( $\rho=-0.21$ ,  $P=0.01$ ), *Corynebacterium* ( $\rho=-0.17$ ,  $P=0.04$ ) y *Staphylococcus* ( $\rho=-0.29$ ,  $P<0.001$ ).
- La correlación positiva más notoria fue la observada entre *Corynebacterium-Dolosigranulum* ( $\rho=0.75$ ,  $P<0.001$ ).

#### **Modelos de clasificación Random Forest**

- Los modelos de clasificación de Random Forest permitieron discriminar casos de controles combinando sólo parámetros microbiológicos evaluados en muestras nasofaríngeas.

- Las curvas ROC (del inglés *Receiver Operating Characteristic*) mostraron áreas bajo la curva (AUCs, del inglés *Area Under the Curve*) de 0.90 (IC: 0.83-0.97) para la clasificación de casos de ENI vs. controles sintomáticos, AUC de 0.86 (IC: 0.78-0.94) para la clasificación de casos de ENI vs. controles sanos y AUC de 0.86 (IC: 0.78-0.93) para la clasificación de casos de ENI vs. todos los controles.
- Las variables más importantes para la predicción de clases asociadas a ENI fueron la detección de serotipos de neumococo invasivos y cubiertos por la VNC13, la colonización por neumococo y elevada carga en nasofaringe medida por PCR cuantitativa (independientemente del serotipo) y la elevada abundancia de *Streptococcus* por análisis del gen ARNr 16S.
- Predictores importantes asociados a los controles fueron la elevada abundancia de los géneros *Dolosigranulum*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Gemella* y otros, medida por análisis del gen ARNr 16S.





## Tercer artículo

### **Rapid increase of oral bacteria in nasopharyngeal microbiota after antibiotic treatment in children with invasive pneumococcal disease**

*"Rápido aumento de bacterias típicas de la cavidad oral en la microbiota nasofaríngea de niños con enfermedad neumocócica invasiva tras el tratamiento antibiótico"*

*Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Oct;11:744727. doi: 10.3389/fcimb.2021.744727

**Henares D**, Rocafort M, Brotons P, de Sevilla MF, Mira A, Launes C, Cabrera-Rubio R, Muñoz-Almagro C





# Rapid Increase of Oral Bacteria in Nasopharyngeal Microbiota After Antibiotic Treatment in Children With Invasive Pneumococcal Disease

## OPEN ACCESS

Desiree Henares<sup>1,2</sup>, Muntsa Rocafort<sup>1,2</sup>, Pedro Brotons<sup>1,2,3</sup>, Mariona F. de Sevilla<sup>2,4</sup>, Alex Mira<sup>2,5</sup>, Cristian Launes<sup>1,2,4</sup>, Raul Cabrera-Rubio<sup>6,7†</sup> and Carmen Muñoz-Almagro<sup>1,2,3\*†</sup>

### Edited by:

Sven Hammerschmidt,  
University of Greifswald, Germany

### Reviewed by:

Anh K. Lam,  
Indiana University, United States  
Tiffany Zarrella,  
National Institutes of Health (NIH),  
United States  
Markus Hilty,  
University of Bern, Switzerland

### \*Correspondence:

Carmen Muñoz-Almagro  
cma@sjdhospitalbarcelona.org;  
cmunoz@uic.es

†These authors have contributed  
equally to this work and share  
senior authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Bacterial Pathogenesis,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and  
Infection Microbiology

Received: 20 July 2021

Accepted: 10 September 2021

Published: 12 October 2021

### Citation:

Henares D, Rocafort M, Brotons P,  
de Sevilla MF, Mira A, Launes C,  
Cabrera-Rubio R and  
Muñoz-Almagro C (2021) Rapid  
Increase of Oral Bacteria in  
Nasopharyngeal Microbiota After  
Antibiotic Treatment in Children With  
Invasive Pneumococcal Disease.  
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:744727.  
doi: 10.3389/fcimb.2021.744727

<sup>1</sup> Institut de Recerca Sant Joan de Deu, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain, <sup>2</sup> CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>3</sup> School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain, <sup>4</sup> Pediatric Department, Hospital Sant Joan de Deu, University of Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>5</sup> Department of Health and Genomics, Center for Advanced Research in Public Health, Fundacion para el Fomento de la Investigacion Sanitaria y Biomedica de la Comunitat Valenciana (FISABIO), Valencia, Spain, <sup>6</sup> Teagasc Food Research Centre (TEAGASC), Moorepark, Fermoy, Ireland, <sup>7</sup> APC Microbiome Institute, University College Cork, Cork, Ireland

**Introduction:** Antibiotics are commonly prescribed to young children for treating bacterial infections such as invasive pneumococcal disease (IPD) caused by *Streptococcus pneumoniae*. Despite the obvious benefits of antibiotics, little is known about their possible side effects on children's nasopharyngeal microbiota. In other ecological niches, antibiotics have been described to perturb the balanced microbiota with short- and long-term effects on children's health. The present study aims to evaluate and compare the nasopharyngeal microbiota of children with IPD and different degree of antibiotic exposure.

**Methods:** We investigated differences in nasopharyngeal microbiota of two groups of children <18 years with IPD: children not exposed to antibiotics before sample collection (n=27) compared to children previously exposed (n=54). Epidemiological/clinical data were collected from subjects, and microbiota was characterized by Illumina sequencing of V3-V4 amplicons of the 16S rRNA gene.

**Results:** Main epidemiological/clinical factors were similar across groups. Antibiotic-exposed patients were treated during a median of 4 days (IQR: 3–6) with at least one beta-lactam (100.0%). Higher bacterial richness and diversity were found in the group exposed to antibiotics. Different streptococcal amplicon sequence variants (ASVs) were differentially abundant across groups: antibiotic use was associated to lower relative abundances of *Streptococcus* ASV2 and *Streptococcus* ASV11 (phylogenetically close to *S. pneumoniae*), and higher relative abundances of *Streptococcus* ASV3 and *Streptococcus* ASV12 (phylogenetically close to viridans group streptococci). ASVs assigned to typical bacteria from the oral cavity, including *Veillonella*, *Alloprevotella*, *Porphyromonas*, *Granulicatella*, or *Capnocytophaga*, were associated to the antibiotic-

exposed group. Common nosocomial genera such as *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, and *Pseudomonas* were also enriched in the group exposed to antibiotics.

**Conclusion:** Our results point toward a reduction of *S. pneumoniae* abundance on the nasopharynx of children with IPD after antibiotic treatment and a short-term repopulation of this altered niche by oral and nosocomial bacteria. Future research studies will have to evaluate the clinical implications of these findings and if these populations would benefit from the probiotic/prebiotic administration or even from the improvement on oral hygiene practices frequently neglected among hospitalized children.

**Keywords:** children, nasopharyngeal microbiota, invasive pneumococcal disease (IPD), antibiotics, oral bacteria, nosocomial bacteria

## INTRODUCTION

Antibiotics prescribed for treating infectious diseases save millions of lives every year, but limited information is available about their impact on the human microbiome and consequences on health. The side effects of antibiotics have been described on the gut microbiota, including transient or profound loss of specific bacterial species, reduction of microbial diversity, and loss of colonization resistance (Kim et al., 2017). In hospitalized patients, antibiotic use favors colonization by nosocomial and appearance of multidrug-resistant pathogens thus increasing the risk for healthcare-associated infections (Kim et al., 2017). Even long-term effects on children's health including obesity or diabetes have been linked to aberrant microbiomes altered by antibiotics (Boursi et al., 2015; Tai et al., 2015).

With respect to the respiratory tract, different authors have reported changes in throat, oropharynx, and lung microbiota of adult patients subjected to long-term antibiotic intake for different infections or chronic respiratory conditions (Hong et al., 2016; Wang et al., 2017; Choo et al., 2018). However, there is scarce research on the effects that occurred on children's nasopharynx, the ecological niche of the main pathogens causing disease in pediatric populations (Cleary and Clarke, 2017). Moreover, young children are subjected to a high number of short-term antibiotic prescriptions, especially for treating acute respiratory infections (Fleming-Dutra et al., 2016; Orlando et al., 2020) such as invasive pneumococcal disease (IPD).

IPD is a major cause of morbi-mortality worldwide with high incidence among children under 5 years (GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators, 2018; Wahl et al., 2018). IPD is caused by *Streptococcus pneumoniae*, a bacteria that normally colonizes the nasopharynx of children asymptotically but can occasionally cause pneumonia, the most frequent manifestation, or other serious clinical syndromes including sepsis or meningitis (Wahl et al., 2018). Differential susceptibility to IPD might be partly explained by the nasopharyngeal microbiota, which could play a role in the transition of *S. pneumoniae* from colonization to disease states (Camelo-Castillo et al., 2019).

Management of IPD requires antibiotic treatment with varying doses, duration, and administration routes according to clinical and patient's characteristics (NICE, 2019). Since

antibiotics are crucial for appropriate treatment of IPD but also may result in perturbations of the ecological niche of *Streptococcus pneumoniae*, further insight is needed into how this disturbance is produced and what bacteria are leading the repopulation of the nasopharynx so we can counteract antibiotic-derived unwanted effects in our microbiota. Antibiotics side effects may indirectly impact children's health by causing microbiota imbalances that have been linked to pathogenesis of several respiratory infections (Bosch et al., 2017; Lanasma et al., 2017) and chronic respiratory disorders (Hahn et al., 2018), or by rising antibiotic-resistant bacteria that have been described to persist for long time and cause infections associated to higher rates of treatment failure and mortality (Sjölund et al., 2005; Jernberg et al., 2007; Jernberg et al., 2010; Friedman et al., 2016). The present study aims to analyze and compare the nasopharyngeal microbiota of children hospitalized with IPD and different degree of exposure to antibiotics.

## METHODS

### Study Design, Setting, and Participants

A cross-sectional study was conducted at Sant Joan de Deu Barcelona Children's Hospital (HSJD) with children prospectively recruited from January 2014 to December 2018. The criteria for inclusion in the study were as follows: 1) <18 years of age; 2) admission to HSJD with clinical suspicion of IPD; 3) microbiological confirmation of IPD by isolation of *S. pneumoniae* and/or DNA detection of *S. pneumoniae* in any normally sterile body fluid (Camelo-Castillo et al., 2019); and 4) nasopharyngeal sample collected at any time during hospital stay for diagnostic or research purposes. Exclusion criteria were not signing informed consent or belonging to a previously defined clinical risk group for developing IPD (Gov.UK, 2020).

Patients not treated or treated only during 24 h before sample collection were considered as cases not exposed to antibiotics, while patients treated for more than 24 h prior to sample collection were considered as cases exposed to antibiotics. Different subjects were included in each group. This criterion was adopted on the basis of previous literature reporting that the sensitivity of molecular-based techniques on respiratory samples

is not affected by a relatively low time of exposition to antibiotics (Johansson et al., 2008).

### Sample and Data Collection

Nasopharyngeal aspirates (NPAs) were collected and immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processed (Camelo-Castillo et al., 2019). Antibiotic types, administration route, and exposure time before and during hospital stay were registered for each case. Relevant epidemiological and other clinical data were recorded from each participant through the parent's interview or electronic medical record, such as delivery mode or pneumococcal vaccination status (categorized into nonvaccinated children or children  $\geq 1$  dose of 7-, 10-, or 13-valent pneumococcal conjugate vaccines (PCVs)). Microbiological data were obtained through laboratory analyses. Pneumococcal serotypes 1, 3, 4, 5, 7F, 8, 9A, 9V, 12F, 14, 18C, and 19A were considered as serotypes with high invasive disease potential (Camelo-Castillo et al., 2019). A detailed list and description of the variables collected is included in the metadata file.

### Laboratory Analyses

Bacterial DNA was extracted from NPAs by the automated system NucliSENS easyMag (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). A duplex real-time PCR targeting *lytA* and *Rnase P* genes was used for pneumococcal DNA detection/quantification (Camelo-Castillo et al., 2019; CDC and Ncird). All positive *S. pneumoniae* samples were further serotyped (Selva et al., 2012). A multiplex Real-Time PCR Anyplex TM II RV16 (Seegene, Seoul, Korea) was used to detect DNA/RNA from 16 human respiratory viruses. Nasopharyngeal microbiota was characterized by 16S rRNA gene sequencing. The V3-V4 region was amplified and sequenced with Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, California, USA) as previously described (Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation). To control for potential contaminants, 17 negative controls were extracted, amplified, and sequenced with the samples.

### Bioinformatic and Statistical Analyses

Reads were processed using the DADA2 pipeline (Callahan et al., 2016) obtaining exact amplicon sequence variants (ASVs). ASVs mapping to the human genome (GRCh38) using the Burrow-Wheeler Aligner in Deconseq v0.4.3 were filtered out (Schmieder and Edwards, 2011). Taxonomic annotation of ASVs from kingdom to genus was performed by DADA2 using the Ribosomal Database Project (RDP) training set 16. ASVs were further classified to species by an exact matching approach using function addSpecies from DADA2. Finally, Decontam R package compared prevalence of ASVs in real samples and negative controls (Davis et al., 2018), identifying contaminant ASVs that were removed from downstream analyses.

All statistical analyses were performed with R version 3.6.3. Continuous variables were described as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR) for parametric and nonparametric variables, respectively. Significance of continuous and normally distributed data was

assessed by t-test for group comparisons. In case of nonparametric data, Wilcoxon tests were performed. For categorical data, significance was established through chi-square test or Fisher's exact test if  $\geq 25\%$  of cells presented expected frequencies  $\leq 5$ .

Samples were rarefied to minimum sample depth (12,601 sequences) for alpha-diversity analyses. Microbiota richness and diversity were estimated through the calculation of Chao1 and Shannon indices for each rarefied sample using the phyloseq R package (McMurdie and Holmes, 2013), and comparisons by group according to antibiotic exposure were made with linear regression analysis and accounting for confounding factors as copredictors (age, gender, seasonality, vaccination, and severity measured by ICU admission and length of hospital stay). PERMANOVA test from vegan R package (Oksanen et al., 2018) evaluated overall differences on microbiota structure according to antibiotic exposure using a Bray-Curtis matrix of relative abundance data of ASVs. In the PERMANOVA model, we also controlled for the confounding factors described above by including them as covariates. A Random Forest classification model was built in order to identify the most discriminative ASVs between subjects not exposed and exposed to antibiotics using the randomForest R package (Package 'randomForest') with default parameters and including all ASVs as explanatory variables as well as confounding variables as covariates. Random Forest is a classification algorithm evolving from the combination of many decision trees. A cross-validation is already built-in in Random Forest, since each tree in the forest has its own training and testing data; each tree uses bootstrapped samples from original data as training set and leaves one-third of data for testing, called out-of-bag (OOB) data. OOB data are used on each tree to predict the outcome, the votes for each predicted outcome from all trees are averaged, and the most voted outcome is selected as the final prediction. Therefore, the out-of-bag error predictions of the classifier were used to calculate the ROC curve and the corresponding area under the curve (AUC) as a measure of the performance of the model. Each predictor variable of the model was given an importance score (mean decrease accuracy), which measures the contribution of each feature to the performance of the model, with higher values indicating higher importance. Specifically, the MDA is the mean decrease in the accuracy over all out-of-bag cross-validated predictions when the values of the variable are randomly permuted after training compared to the original observations. The direction of the association of each quantitative feature was estimated *post hoc* with Cliff's delta test. Finally, most frequent bacterial genera with species implicated in healthcare-associated infections among infants and children were specifically selected in the study (Zingg et al., 2017), and its relative abundances were compared by group using Wilcoxon tests in order to find a possible association with antibiotics.

A phylogenetic tree was constructed containing all streptococcal-type strains from RDP database v11.5 and main streptococcal ASVs detected in our dataset. Cutadapt v1.9 trimmed V3-V4 regions for all the selected RDP streptococcal strains (Martin, 2011), and overall multiple sequence alignment was performed with MAFFT v7.4 (Katoh and Standley, 2013). FastTree inferred the phylogenetic tree according to

maximum-likelihood methods with script `make_phylogeny.py` (Price et al., 2010).

## RESULTS

### Characteristics of Participants

A total number of 168 cases with IPD were screened for participation in the study. Eighty-one of them met inclusion criteria, with a median age of 32 months (IQR: 18–49) and 58% were male. NPA was collected before receiving antibiotics or within the first 24 h of antibiotic intake in 27 patients (median time=0 days, IQR: 0–0.5), and were assigned to the group not exposed to antibiotics. The 54 remaining inpatients were assigned to the antibiotic-exposed group (median time between the first antibiotic intake and sample collection=4 days, IQR: 3–6). The two groups did not present significant differences either in epidemiological variables or in DNA/RNA viral detections or virulence of pneumococcus causing IPD. Clinical manifestations, days of fever before sample collection, length of hospital stay, and complications were similar among exposed and not-exposed inpatients (Table 1).

All subjects exposed to antibiotics before sample collection were treated with beta-lactam antibiotics (100.0%, n=54), and 13 received combined therapy with another antibiotic type (24.1%). Most patients were intravenously administered with antibiotics (n=50, 92.6%), except for four subjects who were exclusively orally treated prior to NPA sample collection.

### Increased Richness and Diversity in the Nasopharynx of Children With IPD Exposed to Antibiotics

A total number of 4,150,123 good quality sequences were obtained from samples and negative controls. This represented a median of 51,309 sequences per sample (IQR: 38,194–73,119) and 468 sequences per negative control (IQR: 192–765) ( $P<0.001$ ). After contaminant removal, 47,323 sequences per sample (IQR: 32,410–64,945) were kept, corresponding to 3,381 ASVs. A median number of 80 ASVs were detected per sample (IQR: 42–129). Tables S1, S2 show the main ASVs with mean relative abundances over 0.1% in each group.

For alpha diversity, higher bacterial Chao1 richness (94.8 [IQR: 57.5–137.5] vs. 44.0 [IQR: 17.7–68.0]) ( $P<0.001$ ,  $R^2 = 0.20$ ) and higher Shannon diversity (2.2 [IQR: 1.5–2.8] vs. 1.6 [IQR: 1.2–2.1]) ( $P=0.01$ ,  $R^2 = 0.18$ ) values were associated to the group exposed to antibiotics (Figures 1A, B). For the overall microbiota structure, PERMANOVA analyses further confirmed that both groups presented significant differences on their bacterial composition ( $P<0.001$ ,  $R^2 = 0.03$ ) (Figure 1C).

### Decreased Abundances of *S. pneumoniae* and Enrichment of Other Streptococci in the Nasopharynx of Children With IPD Exposed to Antibiotics

A specific pneumococcal qPCR demonstrated lower colonization rates (66.7% vs. 100%,  $P=0.002$ ) and lower pneumococcal loads

(4.6 [IQR: 0–5.8]  $\log_{10}$ copies/ml vs. 6.3 [IQR: 5.3–6.7]  $\log_{10}$ copies/ml,  $P<0.001$ ) in the nasopharynx of patients exposed to antibiotics vs. not exposed, without significant differences in the invasive disease potential of nasopharyngeal serotypes detected (invasive serotypes; 50.0% vs. 51.8%,  $P=1.0$ ) or in their coverage by PCV13 vaccine (50.0% vs. 51.8%,  $P=1.0$ )

Analyses with 16S rRNA data not only showed lower abundance of *S. pneumoniae* associated to antibiotic use but also revealed the increase in other streptococci. Overall, a total of 373 ASVs were assigned to *Streptococcus* at the genus level representing the 31.2% of total reads in this dataset. However, 5 ASVs were the most abundant contributing to 25.6% of total reads and 82.2% of the total abundance of reads assigned to *Streptococcus* (Figure 2A). When the relative abundances of these five ASVs were compared by group, four of them were differently distributed: the group not exposed to antibiotics was enriched in *Streptococcus* ASV2 ( $P=0.006$ ) and *Streptococcus* ASV11 ( $P=0.009$ ), while exposed patients were enriched in *Streptococcus* ASV3 ( $P<0.001$ ) and *Streptococcus* ASV12 ( $P<0.001$ ) (Figure 2B). Interestingly, a streptococcal phylogenetic tree confirmed that *S. pneumoniae* type strain was most closely related to ASV2 and ASV11, while ASV3 and ASV12 were more phylogenetically close to *Streptococcus mitis/oralis/infantis* type strains (Figure S1).

### Association of Antibiotic Exposure With Increased Abundance of Oral Bacteria in the Nasopharynx of Children With IPD

The results from the Random Forest model demonstrated that nasopharyngeal microbiota composition was different between both groups. The microbiota features exhibited a good discriminatory power for distinguishing inpatients not exposed to antibiotics from those exposed (AUC=0.80 (95% CI:0.69–0.92)) (Figure 3A). The top 50 features with higher importance in classifying these patients, as measured by the MDA score, were plotted in Figure 3B. *Moraxella* ASV1, *Moraxella* ASV7, *Streptococcus* ASV11, and *Streptococcus* ASV2 were found among the top most important features associated to the patients not exposed to antibiotics as determined *post hoc* with Cliff's delta test. On the contrary, *Streptococcus* ASV3, *Streptococcus* ASV12, *Staphylococcus* ASV18, as well as several ASVs assigned to *Veillonella*, *Alloprevotella*, *Porphyromonas*, *Delftia*, *Capnocytophaga*, *Granulicatella*, *Neisseria*, and other genera were among the top most important features associated to antibiotic use. Most of these genera include gram-negative and anaerobic bacteria frequently found in the oral cavity (Aas et al., 2005; Mira et al., 2017; Dzidic et al., 2018). Further analyses at the genus level located *Prevotella*, *Capnocytophaga*, and *Veillonella* as the most important predictors associated to antibiotic exposure among children with IPD (Figure S2). Moreover, differential ranking analysis with Songbird also supported these findings (Figure S3).

### Overrepresentation of Common Nosocomial Bacteria Among Children With IPD Exposed to Antibiotics

*Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia/Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, and

**TABLE 1** | Epidemiological, microbiological, and clinical characteristics of the study groups.

	Not exposed (n=27)	Exposed (n=54)	P-value <sup>a</sup>
<b>Epidemiological characteristics</b>			
Age, months, median (IQR)	33 (19.0-49.5)	28.5 (18.5-48.5)	0.72
Gender, male (%)	12/27 (44.4)	35/54 (64.8)	0.13
Birth weight, grams, mean (sd) <sup>b</sup>	3260 (507)	3358 (444)	0.41
Gestational age, weeks, median (IQR) <sup>c</sup>	40 (38.2-40.4)	40.0 (39.0-40.0)	0.81
House surface per inhabitant, m <sup>2</sup> , median (IQR) <sup>d</sup>	20 (18.1-28.3)	22 (16.7-28.8)	0.87
Seasonality, samples collected during viral season (%) <sup>e</sup>	17/27 (63.0)	31/54 (57.4)	0.81
Ethnicity, Caucasian (%)	16/24 (66.7)	34/48 (70.8)	0.92
Delivery mode, C-section (%)	6/23 (26.1)	7/42 (16.7)	0.55
Breastfeeding (%)	23/26 (88.5)	41/52 (78.8)	0.36 <sup>k</sup>
Breastfeeding duration, months, median (IQR) <sup>e</sup>	6.5 (1.6-12.0)	6.0 (1.0-9.0)	0.41
Schooled (%)	21/26 (80.8)	44/51 (86.3)	0.52 <sup>k</sup>
Family members under 5 years (%)	9/25 (36.0)	12/46 (26.1)	0.55
Parental smoking (%)	8/26 (30.8)	18/49 (36.7)	0.79
Basic educational level (%)	3/19 (15.8)	9/43 (20.9)	0.74 <sup>k</sup>
≥1 dose of Pneumococcal Conjugate Vaccine (%)	15/27 (55.5)	36/52 (69.2)	0.34
<b>Microbiological characteristics</b>			
<b>Viral study</b>			
DNA/RNA viral detection by multiplex PCR (%)	22/27 (81.5)	39/54 (72.2)	0.42 <sup>k</sup>
DNA/RNA viral detection >2 viruses by multiplex PCR (%)	9/27 (33.3)	15/54 (27.8)	0.79
Human rhinovirus/enterovirus (%)	16/27 (59.2)	31/53 (58.5)	1.00
Human respiratory syncytial virus (A and B) (%)	4/26 (15.4)	4/53 (7.5)	0.42 <sup>k</sup>
Human metapneumovirus (%)	1/27 (3.7)	2/53 (3.8)	1.00 <sup>k</sup>
Human coronaviruses (OC43/229E/NL63) (%)	2/27 (7.4)	2/54 (3.7)	0.60 <sup>k</sup>
Human parainfluenza viruses (1,2,3,4) (%)	1/27 (3.7)	6/53 (11.3)	0.41 <sup>k</sup>
Human influenza viruses (A and B) (%)	3/26 (11.5)	4/53 (7.5)	0.67 <sup>k</sup>
Human adenovirus (%)	3/27 (11.1)	8/53 (15.1)	0.74 <sup>k</sup>
Human bocavirus (%)	4/25 (16.0)	6/53 (11.3)	0.71 <sup>k</sup>
<b>Pneumococcal study in invasive samples<sup>#</sup></b>			
Pneumococcal serotype with high invasive disease potential (%)	14/27 (51.8)	18/36 (50.0)	1.00
Pneumococcal serotype covered by PCV13 vaccination (%)	14/27 (51.8)	18/36 (50.0)	1.00
<b>Clinical characteristics</b>			
Time of fever before NPA collection, hours, median (IQR) <sup>f</sup>	120 (78-144)	128 (33-192)	0.82
<b>Blood analytical parameters at admission</b>			
C-Reactive Protein, mg/L, median (IQR) <sup>g</sup>	300 (205-324)	268 (146-335)	0.83
Procalcitonin, ng/ml, median (IQR) <sup>h</sup>	11.3 (6.7-17.2)	4.3 (1.2-15.1)	0.37
Hemoglobin, g/dl, median (IQR) <sup>i</sup>	10.7 (10.1-11.7)	10.8 (9.9-11.6)	0.97
Leukocytes, thousand/mm <sup>3</sup> , mean (SD) <sup>j</sup>	16.8 (8.3)	18.0 (8.9)	0.57
<b>Clinical syndromes</b>			
Complicated pneumonia (%)	16/27 (59.2)	29/54 (53.7)	0.81
Non-complicated pneumonia (%)	7/27 (25.9)	8/54 (14.8)	0.36
Meningitis (%)	3/27 (11.1)	5/54 (9.2)	1.00 <sup>k</sup>
Sepsis (%)	0/27 (0.0)	4/54 (7.4)	0.29 <sup>k</sup>
Bacteremia (%)	1/27 (3.7)	4/54 (7.4)	0.66 <sup>k</sup>
Arthritis (%)	0/27 (0.0)	4/54 (7.4)	0.29 <sup>k</sup>
<b>Hospital stay and complications</b>			
Length of Hospitalization stay, days, median (IQR)	11.0 (8.0-15.0)	10.0 (6.0-15.0)	0.69
ICU admission (%)	4/27 (14.8)	13/54 (24.1)	0.40 <sup>k</sup>
Respiratory support (noninvasive ventilation and/or mechanical ventilation) (%)	2/27 (7.4)	11/54 (20.4)	0.20 <sup>k</sup>
Thoracocentesis (%)	10/27 (37.0)	22/54 (40.7)	0.94

<sup>a</sup>T-test and Wilcoxon test were used for parametric and nonparametric continuous variables, respectively. Chi-square test was used for categorical variables.

<sup>b</sup>Comparisons performed on 25 not exposed cases and 53 exposed cases.

<sup>c</sup>Comparisons performed on 26 not exposed cases and 53 exposed cases.

<sup>d</sup>Comparisons performed on 23 not exposed and 47 exposed cases.

<sup>e</sup>Comparisons performed on 26 not exposed cases and 50 exposed cases.

<sup>f</sup>Comparisons performed on 26 not exposed cases and 52 exposed cases.

<sup>g</sup>Comparisons performed on 26 not exposed cases and 53 exposed cases.

<sup>h</sup>Comparisons performed on 12 not exposed cases and 25 exposed cases.

<sup>i</sup>Comparisons performed on 25 not exposed cases and 51 exposed cases.

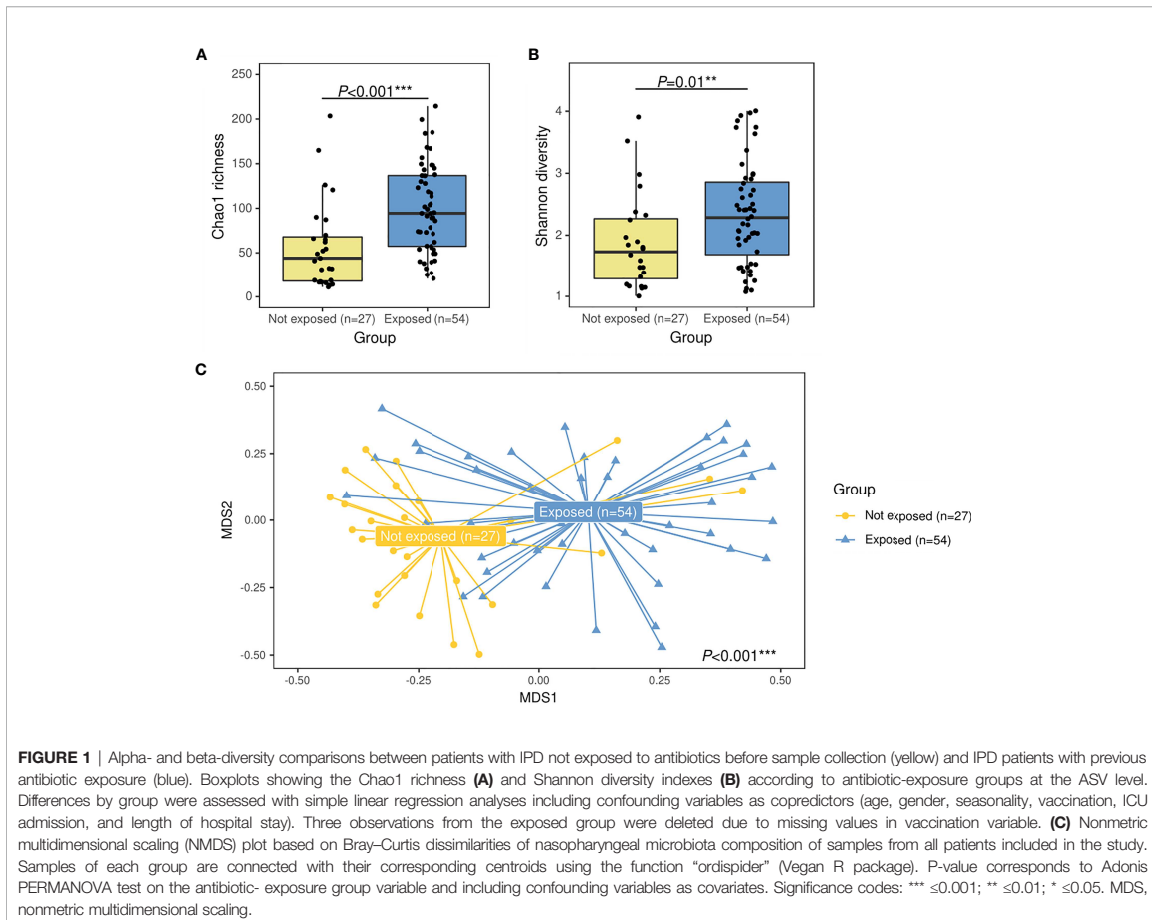
<sup>j</sup>Comparisons performed on 25 not exposed cases and 52 exposed cases.

<sup>k</sup>Fisher exact tests were performed for categorical variables instead of chi-square tests in case of ≥25% of cells presented expected frequencies <5.

<sup>#</sup>Viral season was defined as the period of time corresponding to Influenza A and VRS circulation over the basal levels according to the Surveillance Plan of ARIs in Catalonia (PIDIRAC) (<https://canalsalut.gencat.cat/ca/professionals/vigilancia-epidemiologica/pla-dinformacio-de-les-infeccions-respiratories-agudes-a-catalunya-pidirac/>) and reports from the Hospital Surveillance Network for VRS in Catalonia (Vall d'Hebrón Hospital) (<https://hospital.vallhebron.com/ca/actualitat/publicacions/informe-xarxa-de-vigilancia-hospitalaria-de-vrs>).

<sup>a</sup>A total of three pneumococci could not be serotyped due to low bacterial load.

SD, Standard Deviation; IQR, Interquartile Range; NPA, Nasopharyngeal aspirate.



*Klebsiella* were found in the nasopharynx of our patients with total relative abundances of 6.2%, 0.6%, 0.5%, 0.04%, 0.03%, 0.01%, 0.009%, and 0.003%, respectively. However, only *Staphylococcus* ( $P=0.03$ ), *Acinetobacter* ( $P=0.02$ ), and *Pseudomonas* ( $P=0.02$ ) showed significant differences with higher relative abundances in the antibiotic-exposed group (**Figure 4**). Of note, the antibiotic-exposed children also presented longer hospital stays prior to sample collection (median=3 days [IQR: 2–5] vs. median=0 days [IQR=0–1],  $P<0.001$ ).

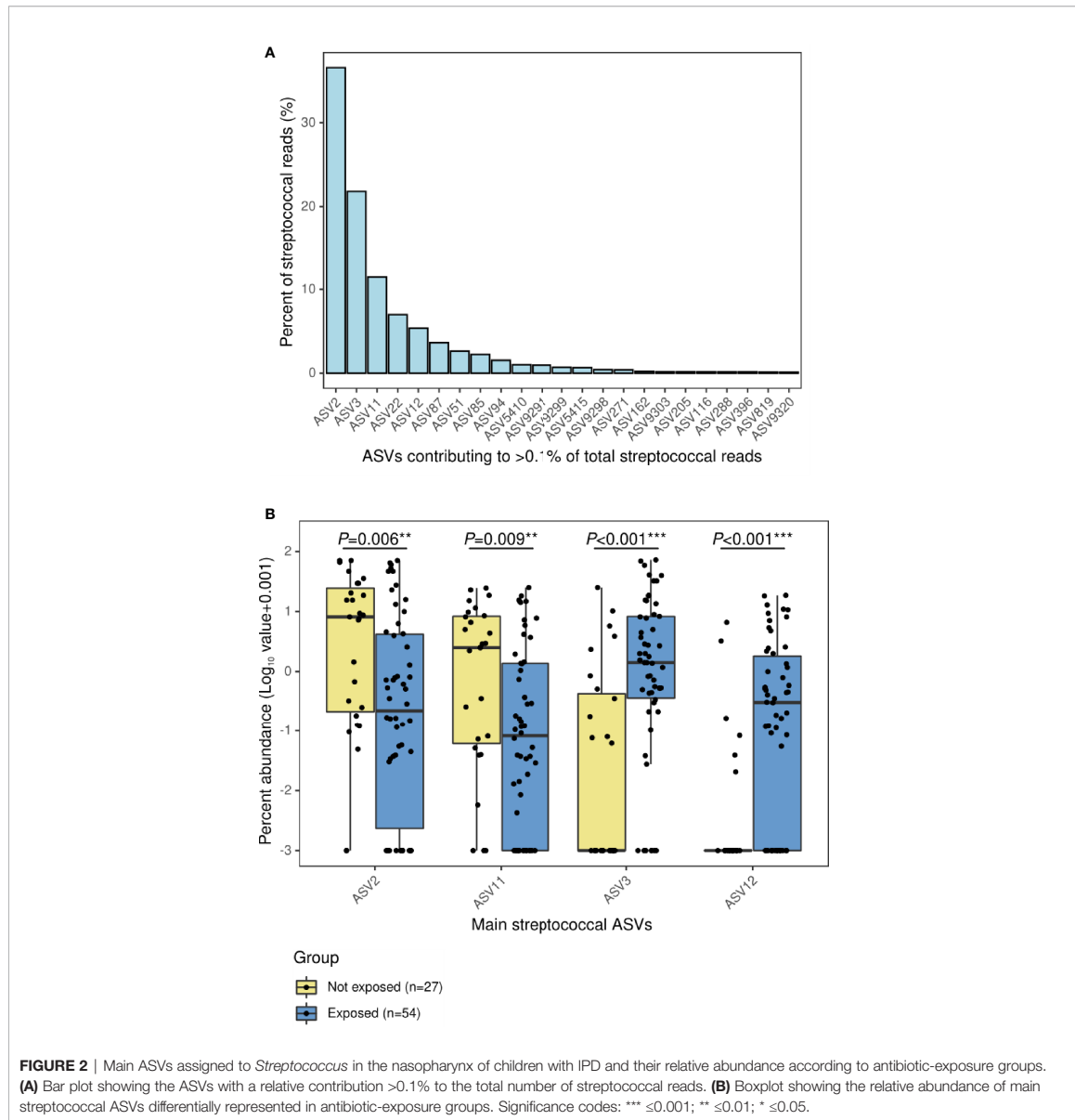
## DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated clear differences in nasopharyngeal microbiota composition of hospitalized children with IPD exposed to antibiotics compared to those not exposed.

Patients exposed to antibiotics presented richer and more diverse microbial nasopharyngeal communities in our study compared to those not exposed. This finding is in contrast to previous literature describing bacterial diversity reduction in gut

microbiota as a consequence of antibiotic intake (Kim et al., 2017) and may reflect differential effects of antibiotics across respiratory and intestinal microbiota ecosystems. Our results are in agreement with those reported in a longitudinal study by Smith et al. (2014) in adults with cystic fibrosis. This study analyzed the effects of intravenous beta-lactam antibiotics for treating exacerbations on sputum samples collected on the first day, at 3–4 days, and 8–10 days since antibiotic initiation. A transient increase in diversity at 3 days was described that normalized at days 8–10, suggesting that timing of sampling after the start of antibiotic could be key to understanding the dysbiotic effect of antibiotic exposure in the respiratory microbiota. Results from other investigations on the impact of antibiotics on respiratory microbiota are scarce and heterogeneous, mostly referring to effects observed after at least 7 days of antibiotic initiation: some studies reported decreases in bacterial community complexity (Lazarevic et al., 2013; Pittman et al., 2017; Kramná et al., 2018), while others showed no significant changes on alpha-diversity measures at all (Zhou et al., 2016; Salter et al., 2017). Other factors such as patient



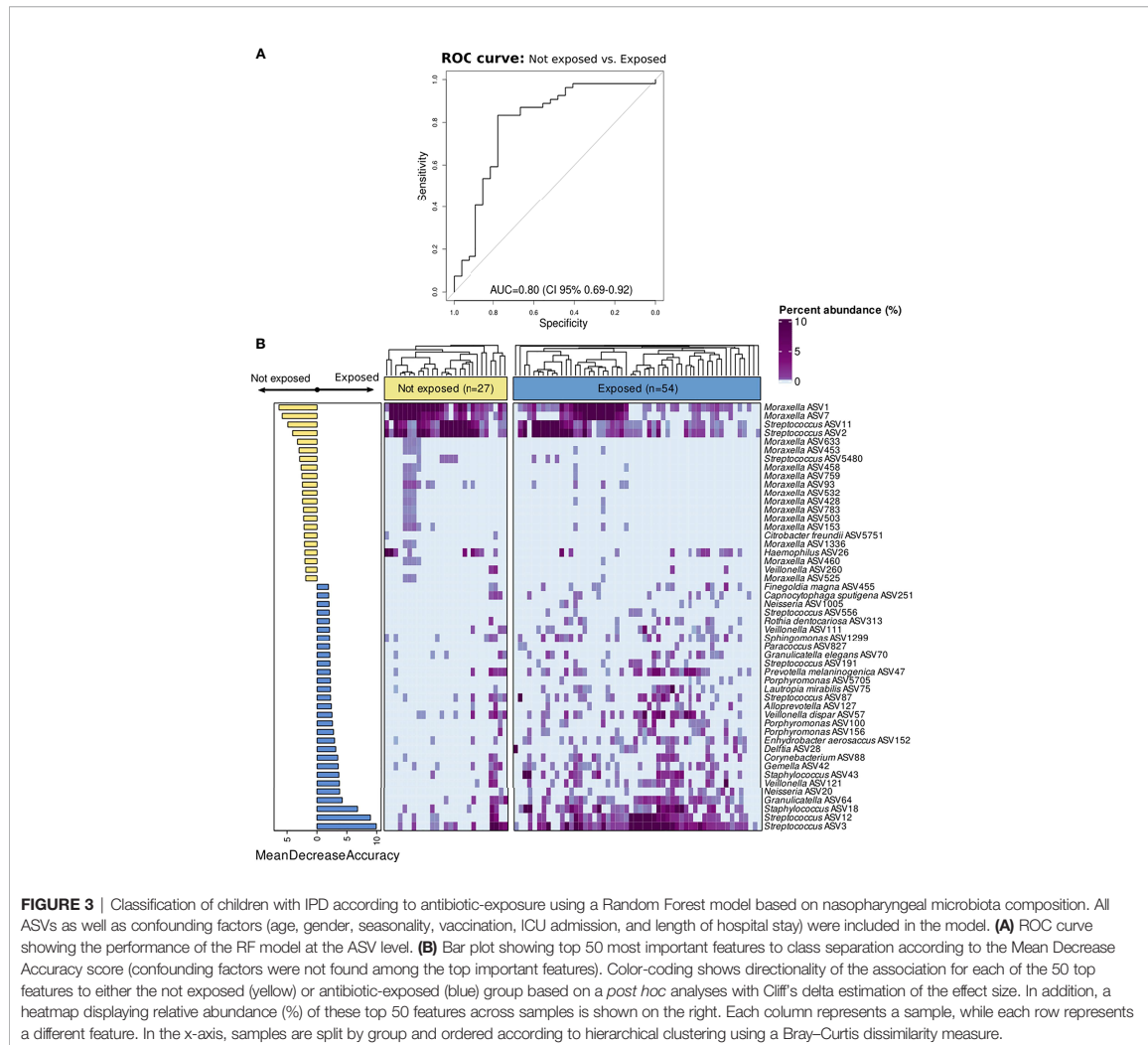


**FIGURE 2 |** Main ASVs assigned to *Streptococcus* in the nasopharynx of children with IPD and their relative abundance according to antibiotic-exposure groups. **(A)** Bar plot showing the ASVs with a relative contribution >0.1% to the total number of streptococcal reads. **(B)** Boxplot showing the relative abundance of main streptococcal ASVs differentially represented in antibiotic-exposure groups. Significance codes: \*\*\* ≤0.001; \*\* ≤0.01; \* ≤0.05.

age, the specific respiratory condition analyzed, and the respiratory tract segment analyzed may explain the heterogeneity of antibiotic impacts on respiratory microbiota reported so far.

Antibiotic exposure was associated to higher relative abundance of ASVs phylogenetically close to viridans group streptococci (VGS), specifically *Streptococcus mitis/oralis/infantis* species, and anaerobic bacteria such as *Prevotella*, *Aloprevotella*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, and *Granulicatella*. These taxa mainly corresponded to commensal bacteria more

frequently found in the oropharynx (Aas et al., 2005; Dzidic et al., 2010; Mira et al., 2017) than the nasopharynx of children (Ho Man et al., 2017; SM et al., 2018). Smith et al. (2014) also described a trend for increased relative abundances of anaerobes in sputum samples, mainly *Veillonella* and *Prevotella*, after 72 h of beta-lactam treatment. Similar effects have been observed with pneumococcal vaccination, which resulted in temporary shifts in nasopharyngeal microbiota composition with increased levels of bacterial diversity and increased relative abundances of *Prevotella*, *Veillonella*, unclassified *Bacteroidetes*, and

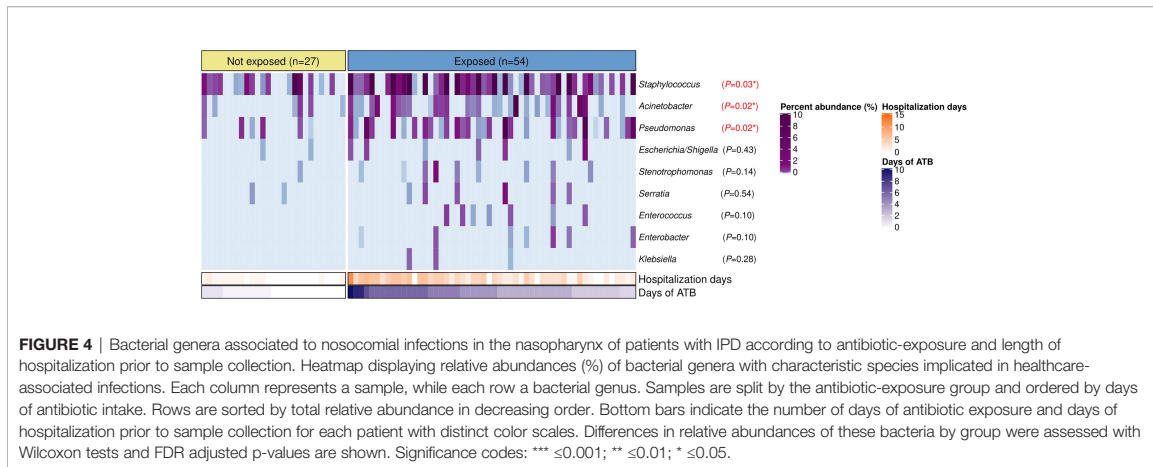


**FIGURE 3 |** Classification of children with IPD according to antibiotic-exposure using a Random Forest model based on nasopharyngeal microbiota composition. All ASVs as well as confounding factors (age, gender, seasonality, vaccination, ICU admission, and length of hospital stay) were included in the model. **(A)** ROC curve showing the performance of the RF model at the ASV level. **(B)** Bar plot showing top 50 most important features to class separation according to the Mean Decrease Accuracy score (confounding factors were not found among the top important features). Color-coding shows directionality of the association for each of the 50 top features to either the not exposed (yellow) or antibiotic-exposed (blue) group based on a *post hoc* analyses with Cliff's delta estimation of the effect size. In addition, a heatmap displaying relative abundance (%) of these top 50 features across samples is shown on the right. Each column represents a sample, while each row represents a different feature. In the x-axis, samples are split by group and ordered according to hierarchical clustering using a Bray-Curtis dissimilarity measure.

*Leptotrichia* (Biesbroek et al., 2014). Other nonpneumococcal streptococci also raised after vaccination, while pneumococcal-vaccine serotypes decreased. Despite different action mechanisms, both antibiotics and vaccination may lead to eliminating pneumococcus from nasopharynx, with probable displacement of the species detected. Our study suggests that colonizing bacteria from oropharynx may be leading the short-term repopulation of nasopharynx after antibiotic exposure. Although mainly speculative, the poor oral hygiene frequently associated to hospitalized children (Blevins, 2013) is linked to high bacterial loads and increased bacterial colonization (Fourrier et al., 1998; Bordasa et al., 2008; Barbosa et al., 2016; Carrol et al., 2020; Chhaliyil et al., 2020), which may favor the migration of bacteria from oral and dental plaque to the empty nasopharyngeal space left by pneumococcus. Other

plausible mechanisms may include the possibility that oral bacteria were already present in the nasopharynx of children with IPD in very low abundance, and such populations expanded to fully occupy the niche after antibiotic use or the new acquisition of oral bacteria *via* breathing, which may have the opportunity to colonize this niche due to the reduction of pneumococcus abundance.

The importance of these findings must be unveiled. Despite the fact that these bacteria are generally commensal microorganisms from the oropharynx (Aas et al., 2005), it has been demonstrated to be a causative role in local and disseminated infections. VGS are a common cause of bacteremia and infective endocarditis (Desai et al., 2017). Gram-negative bacteria such as *Prevotella*, *Porphyromonas*, and *Veillonella* and gram-positive cocci such as *Granulicatella* are isolated from a considerable proportion of mixed anaerobic



infections in children (Brook, 2002). In addition, some *Prevotella* and *Porphyromonas* species have been described as important pathogens in periodontitis and inextricably linked to systemic chronic disorders as cardiovascular diseases, diabetes, and rheumatoid arthritis, through cross-reactive antibodies and increased levels of systemic inflammation (Bui et al., 2019).

A higher abundance of VGS and typical oral taxa in the nasopharynx of antibiotic-exposed cases despite active treatment could be explained by the considerable rates of resistance to beta-lactam antibiotics described in these bacteria (Nyfors et al., 2003; Desai et al., 2017; Arredondo et al., 2020), or to the biofilm mode of life of some of these species, which may restrict antibiotic penetration (Kouidhi et al., 2015). In addition, VGS constitute a reservoir of antimicrobial resistance genes that have been described to be transferred to more pathogenic organisms like *S. pneumoniae* (Jensen et al., 2015), while anaerobic gram-negative bacteria may protect penicillin-susceptible bacteria through beta-lactamase production, contributing to antibiotic failures (Brook, 2009). Worrying is also the fact that antibiotic exposure in children with IPD and hospitalized for a median of 3 days was associated to increased abundances of *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, and *Acinetobacter*. These genera, specially *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, are not common respiratory commensals and are related to typical multidrug-resistant species causing nosocomial infections (Zingg et al., 2017).

Although it is probable that our findings could be transitory and a recovery of the initial stability of the nasopharyngeal microbiota is reached after antibiotic treatment ends, some changes have been described to persist for long time and for some species to become part of the commensal microbiota. Given the implication of oral bacterial species in multiple disorders and its overrepresentation in the nasopharynx of inpatients with IPD after antibiotic treatment, our study suggests that these patients could benefit from the concurrent administration of probiotics/prebiotics alongside antibiotics that may help to prevent dysbiosis and recover a balanced state of the

microbiota (Rosier et al., 2018; Lee et al., 2021). The role of the oral hygiene in preventing and recovering from such disturbances must be revealed. This practice has demonstrated to reduce colonization and density of oral pathogenic bacteria in the oropharynx as well as to reduce the risk of nosocomial infections (Bordasa et al., 2008; Amaral et al., 2009; Carrol et al., 2020; Chhaliyil et al., 2020; Vilela et al., 2015), and could be useful if the repopulation of the nasopharynx of children with IPD after antibiotic treatment is produced by the expansion of oral bacteria from the oropharynx.

This study is subject to a number of limitations. First, the small sample size may have reduced the statistical power. Nevertheless, we would like to note the valuable cohort of patients recruited in a low-prevalence area for IPD and the lack of previous studies assessing the ecological impact of antibiotics in the nasopharynx of these children. Second, its cross-sectional design only allowed identification of associations without establishing causality. Third, 16S rRNA gene sequencing studies cannot differentiate between live and death bacteria. Fourth, analyses at the species levels could not be performed because of the poor taxonomic resolution at this rank, especially for streptococcal species, possibly due to the use of short-length amplicons and the absence of respiratory tract-dedicated, thoroughly curated 16S rRNA gene databases as occurred in gut microbiota. However, we performed analyses at the ASV level that allowed the finest possible resolution by discriminating unique sequences at the single-nucleotide level. Finally, although a phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences was constructed in order to identify which streptococcal strains were the most phylogenetically close to the streptococcal ASVs detected in our study, other genes may be more suitable for reliable classification of streptococcal species.

Despite these limitations, the associations described here are strong enough to encourage future longitudinal studies that confirm our findings and evaluate the relation of changes observed in nasopharyngeal communities after antibiotic use with short-term and long-term clinical outcomes. Our findings may also encourage shotgun metagenomic studies that help to

describe functional profiles and resistance patterns of nasopharyngeal communities associated to antibiotic use.

In conclusion, our results suggest a reduction of *S. pneumoniae* abundance on the nasopharynx of children with IPD after antibiotic treatment, and a short-term repopulation of this altered niche by oral and nosocomial bacteria. This emphasizes the need for understanding the clinical implications of these antibiotic-derived perturbations as well as the utility of probiotic/prebiotic administration or even oral hygiene improvement in preventing or recovering from such disturbances.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Raw sequence files have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB46580. The metadata file can be found at FigShare repository (<https://figshare.com/s/b52ec8e5a72a49782b77>). The rest of data can be found in the article as supplementary files.

## ETHICS STATEMENT

This research was approved by the Ethics Committee of HSJD (PIC 70-15 and PIC 137-16) and conducted in compliance with the World Medical Association's Declaration of Helsinki. All parents and/or legal guardians signed informed consent for children participating in the study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and study design: CM-A and RC-R. Funding: DH and CM-A. Case-control recruitment and data collection: DH, MS, and CL. Microbiological characterization: DH and AM.

## REFERENCES

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., and Dewhirst, F. E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5721–5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
- Arredondo, A., Blanc, V., Mor, C., Nart, J., and León, R. (2020). Resistance to  $\beta$ -Lactams and Distribution of  $\beta$ -Lactam Resistance Genes in Subgingival Microbiota From Spanish Patients With Periodontitis. *Clin. Oral. Investig.* 24, 4639–4648. doi: 10.1007/s00784-020-03333-1
- Amaral, S. M., Cortés, A. Q., and Pires, F. R. (2009). Nosocomial Pneumonia: Importance of the Oral Environment. *J. Bras. Pneumol.* 35, 1116–1124. doi: 10.1590/S1806-37132009001100010
- Barbosa, C. G., Leme, T. D., Barbosa, A. G., Miranda, A. F., Piemonte, J. A., and Barreto, A. C. (2016). Oral Microbial Colonization in Pediatric Intensive Care Unit Patients. *J. Dent. Child. (Chic)* 83, 53–59.
- Biesbroek, G., Wang, X., Keijsers, B. J. F., Eijkemans, R. M. J., Trzciński, K., Rots, N. Y., et al (2014). Seven-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and Nasopharyngeal Microbiota in Healthy Children. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 201–210. doi: 10.3201/eid2002.131220
- Blevins, J. Y. (2013). Status of Oral Health Care in Hospitalized Children. *MCN Am. J. Matern. Nurs.* 38, 115–119. doi: 10.1097/NMC.0b013e318269daac
- Bordasa, A., McNaba, R., Staples, A. M., Bowman, J., Kanapka, J., and Bosmaa, M. P. (2008). Impact of Different Tongue Cleaning >Methods on the Bacterial

Bioinformatics analyses/statistical analyses: DH. Guidance in the analyses: MR and RC-R. Interpretation of results: DH, PB, AM, RC-R, and CM-A. Coordination: RC-R and CM-A. Writing manuscript: DH. Revising manuscript: DH, MR, PB, MS, AM, CL, RC-R, and CM-A. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and the Ministry of Science and Innovation, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) [PI16/00174 (CM-A), FI17/00248 (DH)], and Sant Joan de Deu Foundation [AFR2015 (CM-A)]. DH also received a grant from Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) for a research stay. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Teagasc Food Research Centre, in particular Dr. Paul Cotter, for hosting a research stay of DH in his center. We also thank Amaresh Pérez-Argüello Cristina Esteve, Juan Jose Garcia-Garcia, and Daniel Penela for their contribution in taking care of patients and/or microbiological studies.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.744727/full#supplementary-material>

- Load of the Tongue Dorsum. *Arch. Oral. Biol.* 53 (Suppl 1), S13–S18. doi: 10.1016/S0003-9969(08)70004-9
- Bosch, A. A. T. M., De Steenhuijsen Pijters, W. A. A., Van Houten, M. A., Chu, M. L. J. N., Biesbroek, G., Kool, J., et al (2017). Maturation of the Infant Respiratory Microbiota, Environmental Drivers, and Health Consequences. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 196, 1582–1590. doi: 10.1164/rccm.201703-0554OC
- Boursi, B., Mamtani, R., Haynes, K., and Yang, Y. X. (2015). The Effect of Past Antibiotic Exposure on Diabetes Risk. *Eur. J. Endocrinol.* 172, 639–648. doi: 10.1530/EJE-14-1163
- Brook, I. (2002). Anaerobic Infections in Children. *Microbes Infect.* 4, 1271–1280. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01656-8
- Brook, I. (2009). The Role of Beta-Lactamase-Producing-Bacteria in Mixed Infections. *BMC Infect. Dis.* 9, 202. doi: 10.1186/1471-2334-9-202
- Bui, F. Q., Almeida-da-Silva, C. L. C., Huynh, B., Trinh, A., Liu, J., Woodward, J., et al (2019). Association Between Periodontal Pathogens and Systemic Disease. *Biomed. J.* 42, 27–35. doi: 10.1016/j.bj.2018.12.001
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., and Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-Resolution Sample Inference From Illumina Amplicon Data. *Nat. Methods* 13, 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
- Camelo-Castillo, A., Henares, D., Brotons, P., Galiana, A., Rodriguez, J. C., Mira, A., et al. (2019). Nasopharyngeal Microbiota in Children With Invasive Pneumococcal Disease: Identification of Bacteria With Potential Disease-

- Promoting and Protective Effects. *Front. Microbiol.* 10, 11. doi: 10.3389/fmicb.2019.00011
- Carroll, D. H., Chassagne, F., Dettweiler, M., and Quave, C. L. (2020). Antibacterial Activity of Plant Species Used for Oral Health Against *Porphyromonas Gingivalis*. *PLoS One* 15, e0239316. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0239316
- CDC and Ncidr Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis - CHAPTER 8: Identification and Characterization of *Streptococcus Pneumoniae*. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc/index.htm> (Accessed August 27, 2021).
- Chhalliyil, P., Fischer, K., Schoel, B., and Chhalliyil, P. (2020). Impact of Different Bedtime Oral Cleaning Methods on Dental-Damaging Microbiota Levels. *Dent. Hypotheses* 11, 40–46. doi: 10.4103/denthyp.denthyp\_7\_20
- Choo, J. M., Abell, G. C. J., Thomson, R., Morgan, L., Waterer, G., Gordon, D. L., et al (2018). Impact of Long-Term Erythromycin Therapy on the Oropharyngeal Microbiome and Resistance Gene Reservoir in Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis. *mSphere* 3, e00103–e00118. doi: 10.1128/mSphere.00103-18
- Cleary, D. W., and Clarke, S. C. (2017). The Nasopharyngeal Microbiome. *Emerg. Top. Life Sci.* 1, 297–312. doi: 10.1042/ETLS20170041
- Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A., and Callahan, B. J. (2018). Simple Statistical Identification and Removal of Contaminant Sequences in Marker-Genes and Metagenomics Data. *Microbiome* 6, 226. doi: 10.1186/s40168-018-0605-2
- Desai, N., Steenbergen, J., and Katz, D. E. (2017). “Antibiotic Resistance of Non-Pneumococcal Streptococci and Its Clinical Impact,” in *Antimicrobial Drug Resistance* (Switzerland: Springer International Publishing), 791–810. doi: 10.1007/978-3-319-47266-9\_2
- Dzidic, M., Collado, M. C., Abrahamsson, T., Artacho, A., Stensson, M., Jenmalm, M. C., et al (2018). Oral Microbiome Development During Childhood: An Ecological Succession Influenced by Postnatal Factors and Associated With Tooth Decay. *ISME J.* 12, 2292–2306. doi: 10.1038/s41396-018-0204-z
- Fleming-Dutra, K. E., Hersh, A. L., Shapiro, D. J., Bartoces, M., Enns, E. A., File, T. M., et al (2016). Prevalence of Inappropriate Antibiotic Prescriptions Among Us Ambulatory Care Visits 2010–2011. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 315, 1864–1873. doi: 10.1001/jama.2016.4151
- Fourrier, F., Duvivier, B., Boutigny, H., Roussel-Delvallez, M., and Chopin, C. (1998). Colonization of Dental Plaque: A Source of Nosocomial Infections in Intensive Care Unit Patients. *Crit. Care Med.* 26, 301–308. doi: 10.1097/00003246-199802000-00032
- Friedman, N. D., Temkin, E., and Carmeli, Y. (2016). The Negative Impact of Antibiotic Resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 416–422. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.002
- GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators (2018). Estimates of the Global, Regional, and National Morbidity, Mortality, and Aetiologies of Lower Respiratory Infections in 195 Countries 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* 18, 1191–1210. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30310-4
- Gov.UK (2020). *Pneumococcal: The Green Book, Chapter 25 - Gov.Uk*. Available at: <https://www.gov.uk/government/publications/pneumococcal-the-green-book-chapter-25> (Accessed August 27, 2021).
- Hahn, A., Warnken, S., Pérez-Losada, M., Freisztat, R. J., and Crandall, K. A. (2018). Microbial Diversity Within the Airway Microbiome in Chronic Pediatric Lung Diseases. *Infect. Genet. Evol.* 63, 316. doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.006
- Ho Man, W., de Steenhuijsen Piters, W. A., and Bogaert, D. (2017). The Microbiota of the Respiratory Tract: Gatekeeper to Respiratory Health. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 259–270. doi: 10.1038/nrmicro.2017.14
- Hong, B. Y., Maulén, N. P., Adami, A. J., Granados, H., Balcels, M. E., and Cervantes, J. (2016). Microbiome Changes During Tuberculosis and Antituberculous Therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 915–926. doi: 10.1128/CMR.00096-15
- Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (15044223 B) Available at: [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) (Accessed August 27, 2021).
- Jensen, A., Valdörsson, O., Frimodt-Møller, N., Hollingshead, S., and Kilian, M. (2015). Commensal *Streptococci* Serve as a Reservoir for  $\beta$ -Lactam Resistance Genes in *Streptococcus Pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3529–3540. doi: 10.1128/AAC.00429-15
- Jernberg, C., Löf, S., Edlund, C., Jansson, J. K., and Se, C. J. (2010). Long-Term Impacts of Antibiotic Exposure on the Human Intestinal Microbiota. *Microbiology* 156, 3216–3223. doi: 10.1099/mic.0.040618-0
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., and Jansson, J. K. (2007). Long-Term Ecological Impacts of Antibiotic Administration on the Human Intestinal Microbiota. *ISME J.* 1, 56–66. doi: 10.1038/ISMEJ.2007.3
- Johansson, N., Kalin, M., Giske, C. G., and Hedlund, J. (2008). Quantitative Detection of *Streptococcus Pneumoniae* From Sputum Samples With Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for Etiologic Diagnosis of Community-Acquired Pneumonia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 255–261. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.10.011
- Katoh, K., and Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- Kim, S., Covington, A., and Pamer, E. G. (2017). The Intestinal Microbiota: Antibiotics, Colonization Resistance, and Enteric Pathogens. *Immunol. Rev.* 279, 90–105. doi: 10.1111/imr.12563
- Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., and Chaieb, K. (2015). Drug Resistance of Bacterial Dental Biofilm and the Potential Use of Natural Compounds as Alternative for Prevention and Treatment. *Microb. Pathog.* 80, 39–49. doi: 10.1016/j.micpath.2015.02.007
- Kramná, L., Dřevínek, P., Lin, J., Kulich, M., and Cinek, O. (2018). Changes in the Lung Bacteriome in Relation to Antipseudomonal Therapy in Children With Cystic Fibrosis. *Folia Microbiol. (Praha)* 63, 237–248. doi: 10.1007/s12223-017-0562-3
- Lanaspa, M., Bassat, Q., Medeiros, M. M., and Muñoz-Almagro, C. (2017). Respiratory Microbiota and Lower Respiratory Tract Disease. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 15, 703–711. doi: 10.1080/14787210.2017.1349609
- Lazarevic, V., Manzano, S., Gaia, N., Girard, M., Whiteson, K., Hibbs, J., et al (2013). Effects of Amoxicillin Treatment on the Salivary Microbiota in Children With Acute Otitis Media. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, e335–e342. doi: 10.1111/1469-0691.12213
- Lee, C. H., Choi, Y., Seo, S. Y., Kim, S. H., Kim, I. H., Kim, S. W., et al (2021). Addition of Probiotics to Antibiotics Improves the Clinical Course of Pneumonia in Young People Without Comorbidities: A Randomized Controlled Trial. *Sci. Rep.* 11, 1–9. doi: 10.1038/s41598-020-79630-2
- Martin, M. (2011). Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet.journal* 17, 10. doi: 10.14806/ej.17.1.200
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- Mira, A., Simon-Soro, A., and Curtis, M. A. (2017). Role of Microbial Communities in the Pathogenesis of Periodontal Diseases and Caries. *J. Clin. Periodontol.* 44, S23–S38. doi: 10.1111/jcpe.12671
- NICE (2019). *Pneumonia (Community-Acquired): Antimicrobial Prescribing NICE Guideline*. Available at: [www.nice.org.uk/guidance/ng138](http://www.nice.org.uk/guidance/ng138) (Accessed August 27, 2021).
- Nyfors, S., Könönen, E., Bryk, A., Syrjänen, R., and Jousimies-Somer, H. (2003). Age-Related Frequency of Penicillin Resistance of Oral *Veillonella*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46, 279–283. doi: 10.1016/S0732-8893(03)00082-8
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., et al (2018). *Titl Community Ecology Package*. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> (Accessed August 27, 2021).
- Orlando, V., Monetti, V. M., Juste, A. M., Russo, V., Mucherino, S., Trama, U., et al (2020). Drug Utilization Pattern of Antibiotics: The Role of Age, Sex and Municipalities in Determining Variation. *Risk Manage. Healthc. Policy* 13, 63–71. doi: 10.2147/RMHP.S223042
- Package ‘randomForest’. (Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/randomForest/randomForest.pdf>) (Accessed August 27, 2021).
- Pittman, J. E., Wylie, K. M., Akers, K., Storch, G. A., Hatch, J., Quante, J., et al (2017). Association of Antibiotics, Airway Microbiome, and Inflammation in Infants With Cystic Fibrosis. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 14, 1548–1555. doi: 10.1513/AnnalsATS.201702-121OC

- Price, M. N., Dehal, P. S., and Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 - Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS One* 5, e9490. doi: 10.1371/journal.pone.0009490
- Rosier, B. T., Marsh, P. D., and Mira, A. (2018). Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J. Dent. Res.* 97, 371–380. doi: 10.1177/0022034517742139
- Salter, S. J., Turner, C., Watthanaworawit, W., de Goffau, M. C., Wagner, J., Parkhill, J., et al (2017). A Longitudinal Study of the Infant Nasopharyngeal Microbiota: The Effects of Age, Illness and Antibiotic Use in a Cohort of South East Asian Children. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 10. doi: 10.1371/journal.pntd.0005975
- Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Fast Identification and Removal of Sequence Contamination From Genomic and Metagenomic Datasets. *PLoS One* 6, e17288. doi: 10.1371/journal.pone.0017288
- Selva, L., del Amo, E., Brotons, P., and Muñoz-Almagro, C. (2012). Rapid and Easy Identification of Capsular Serotypes of Streptococcus Pneumoniae by Use of Fragment Analysis by Automated Fluorescence-Based Capillary Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3451–3457. doi: 10.1128/JCM.01368-12
- Sjölund, M., Tano, E., Blaser, M. J., Andersson, D. I., and Engstrand, L. (2005). Persistence of Resistant Staphylococcus Epidermidis After Single Course of Clarithromycin. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1389–1393. doi: 10.3201/EID1109.050124
- Smith, D. J., Badrick, A. C., Zakrzewski, M., Krause, L., Bell, S. C., Anderson, G. J., et al (2014). Pyrosequencing Reveals Transient Cystic Fibrosis Lung Microbiome Changes With Intravenous Antibiotics. *Eur. Respir. J.* 44, 922–930. doi: 10.1183/09031936.00203013
- Tai, N., Wong, F. S., and Wen, L. (2015). The Role of Gut Microbiota in the Development of Type 1, Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16, 55–65. doi: 10.1007/s11154-015-9309-0
- Teo, S. M., Tang, H. H. F., Mok, D., Judd, L. M., Watts, S. C., Pham, K., et al (2018). Airway Microbiota Dynamics Uncover a Critical Window for Interplay of Pathogenic Bacteria and Allergy in Childhood Respiratory Disease. *Cell Host Microbe* 24, 341–352.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.005
- Vilela, M. C. N., Ferreira, G. Z., Santos, P. S. D. S., and Rezende, N. P. M. D. (2015). Oral Care and Nosocomial Pneumonia: A Systematic Review. *Einstein (São Paulo)* 13, 290–296. doi: 10.1590/S1679-45082015RW2980
- Wahl, B., O'Brien, K. L., Greenbaum, A., Majumder, A., Liu, L., Chu, Y., et al (2018). Burden of Streptococcus Pneumoniae and Haemophilus Influenzae Type B Disease in Children in the Era of Conjugate Vaccines: Global, Regional, and National Estimates for 2000–15. *Lancet Glob. Heal.* 6, e744–e757. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30247-X
- Wang, Z. J., Chen, X. F., Zhang, Z. X., Li, Y. C., Deng, J., Tu, J., et al (2017). Effects of Anti-Helicobacter Pylori Concomitant Therapy and Probiotic Supplementation on the Throat and Gut Microbiota in Humans. *Microb. Pathog.* 109, 156–161. doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.035
- Zhou, Y., Bacharier, L. B., Isaacson-Schmid, M., Baty, J., Schechtman, K. B., Sajol, G., et al (2016). Azithromycin Therapy During Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis: Upper Airway Microbiome Alterations and Subsequent Recurrent Wheeze. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 1215–1219.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.054
- Zingg, W., Hopkins, S., Gayet-Ageron, A., Holmes, A., Sharland, M., Suetens, C., et al (2017). Health-Care-Associated Infections in Neonates, Children, and Adolescents: An Analysis of Paediatric Data From the European Centre for Disease Prevention and Control Point-Prevalence Survey. *Lancet Infect. Dis.* 17, 381–389. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30517-5

**Conflict of Interest:** CM-A reports grants to her organization from Pfizer outside the submitted work and personal fees from Qiagen for presentations at satellite symposiums outside the submitted work.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Henares, Rocafort, Brotons, de Sevilla, Mira, Launes, Cabrera-Rubio and Muñoz-Almagro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

---

## Resumen tercer artículo

Estudio transversal en el que se incluyeron todos los niños <18 años admitidos en HSJD entre enero del 2014 y diciembre del 2018 con confirmación microbiológica de ENI, ausencia de factores de riesgo de ENI y muestra nasofaríngea extraída en algún momento de la hospitalización. Los pacientes se dividieron en dos grupos; aquellos con una exposición antibiótica previa  $\leq 24$  horas (considerados no expuestos o mínimamente expuestos) y pacientes con exposición  $> 24$  horas (considerados altamente expuestos a antibióticos).

Se recogió información clínica, epidemiológica y analítica de cada sujeto reclutado, incluyendo la exposición a antibióticos previamente a la recogida de la muestra. En la muestra de aspirado nasofaríngeo de cada individuo se realizó la detección y cuantificación de neumococo por PCR *lytA*, el tipado capsular mediante técnicas de PCR múltiple y análisis de fragmentos fluorescentes y la detección de dieciséis virus respiratorios utilizando un panel de PCR múltiple. Se caracterizó la composición de microbiota nasofaríngea mediante secuenciación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S utilizando MiSeq de Illumina. Posteriormente se procesaron y analizaron las secuencias.

Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

### ***Características clínicas y epidemiológicas de los casos de ENI***

- Un total de 168 casos con ENI fueron diagnosticados durante el período entre enero de 2014 y diciembre de 2018 en HSJD. De ellos, 81 cumplían criterios de inclusión en el estudio.
- La mediana de edad de los casos fue de 32 meses (RI: 18–49 meses) y el 58.0% fueron varones (n=47).
- La principal manifestación clínica fue la neumonía (n=60), seguida de meningitis (n=8), bacteriemia (n=5), sepsis (n=4) y artritis (n=4).

### ***Exposición antibiótica en los casos de ENI***

- El aspirado nasofaríngeo se recogió antes o durante las primeras 24 horas de tratamiento antibiótico en 27 pacientes y se incluyeron en el grupo no expuesto.
- Cincuenta y cuatro pacientes recibieron  $>24$  horas de antibióticos (mediana 4 días, RI: 3-6) antes de la toma de la muestra y se incluyeron en el grupo de expuestos.
- Todos los pacientes del grupo expuesto recibieron al menos un betalactámico (100.0%, n=54) y la administración fue principalmente intravenosa (92.6%).

### **Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas casos expuestos vs. no expuestos**

- Los dos grupos presentaron una distribución similar de las variables clínicas y epidemiológicas.
- La detección de infección viral fue similar en expuestos (72.7%) vs. no expuestos (81.5%).
- Los casos expuestos a antibióticos presentaron menor carga de neumococo (4.6 log<sub>10</sub>copias/mL [RI:0-5.8] vs. 6.3 log<sub>10</sub>copias/mL [RI: 5.3-6.7],  $P<0.001$ ) y tasas de portadores (66.7% vs. 100.0%  $P=0.002$ ) que los casos no expuestos utilizando una PCR cuantitativa específica.

### **Análisis de diversidad alfa**

- Los niños expuestos a antibióticos presentaron mayores niveles de riqueza que los no expuestos (mediana Chao1=94.8 [RI: 57.5-137.5] vs. 44.0 [RI: 17.7-68.0],  $P<0.001$ ).
- Los niños expuestos a antibióticos presentaron mayores niveles de diversidad que los no expuestos (mediana Shannon=2.2 [RI: 1.5-2.8] vs. 1.6 [RI: 1.2-2.1],  $P=0.01$ ).

### **Análisis de diversidad beta**

- Los análisis de PERMANOVA confirmaron diferencias en la composición de microbiota nasofaríngea entre ambos grupos ( $R^2=0.03$ ,  $P<0.001$ ).

### **Abundancia diferencial**

#### **ASVs asignadas a *Streptococcus***

- Los casos expuestos se asociaron a menor abundancia relativa de *Streptococcus* ASV2 ( $P=0.006$ ) y *Streptococcus* ASV11 ( $P=0.009$ ), filogenéticamente cercanas a *Streptococcus pneumoniae*.
- Los casos expuestos se asociaron a sobrerrepresentación de *Streptococcus* ASV3 ( $P<0.001$ ) y *Streptococcus* ASV12 ( $P<0.001$ ), filogenéticamente cercanas a *Streptococcus mitis/oralis/infantis*.

#### **Géneros asociados a infección nosocomial**

- Los casos expuestos se asociaron a mayor abundancia de *Staphylococcus* ( $P=0.03$ ), *Acinetobacter* ( $P=0.02$ ) y *Pseudomonas* ( $P=0.02$ ), especies implicadas en infección nosocomial.



### **Bacterias típicamente orales**

- Con modelos de clasificación Random Forest fue posible discriminar pacientes expuestos a antibióticos de los no expuestos con elevada precisión (área bajo la curva de 0.80, IC: 0.69-0.92) gracias a la distribución diferencial de las distintas especies que conforman la microbiota nasofaríngea en estos niños.
- Las ASVs más importantes para una correcta clasificación de estos pacientes asociadas al grupo expuesto fueron *Streptococcus* ASV3, *Streptococcus* ASV12, *Staphylococcus* ASV18, así como ASVs asignadas a *Veillonella*, *Alloprevotella*, *Porphyromonas*, *Delftia*, *Capnocytophaga*, *Granulicatella* y otros géneros, la mayoría de ellas bacterias más frecuentes en la cavidad oral que en la nasofaringe.
- Las ASVs más importantes para la correcta clasificación asociadas al grupo no expuesto fueron *Moraxella* ASV1, *Moraxella* ASV7, *Streptococcus* ASV2 y *Streptococcus* ASV11.



## **5. Discusión**



A lo largo de los tres estudios que componen esta tesis se han podido diferenciar perfiles de microbiota nasofaríngea asociados a distintos estados de salud respiratoria en niños y, en concreto, al desarrollo de ENI.

Uno de los hallazgos más significativos de este trabajo de investigación es la identificación de una composición de microbiota nasofaríngea diferencial en niños sanos. En el primer estudio se observó un perfil de microbiota nasofaríngea dominado por el género *Dolosigranulum* y rico en *Moraxella* asociado a una mayor proporción de controles sanos (82.1%) y una menor proporción de casos de ENI (17.9%), en comparación con los otros perfiles dominados por patobiontes que presentaban mayor proporción de casos enfermos. El potencial rol beneficioso de *Moraxella* y *Dolosigranulum* se corroboró en el segundo estudio. En este segundo estudio se identificó una microbiota nasofaríngea diferencial en niños sanos caracterizada por el enriquecimiento en OTUs asignadas a *Dolosigranulum pigrum*, *Moraxella lincolnii*, *Corynebacterium* spp. y algunas especies típicas de la cavidad oral. Es importante, también, el hecho de que estas bacterias potencialmente beneficiosas, como *D. pigrum* y *M. lincolnii*, no conformaban una proporción importante de las especies detectadas en el tercer estudio en el que sólo se incluyeron casos de ENI.

*Dolosigranulum* es un género con única especie conocida hasta el momento, *Dolosigranulum pigrum* [311]. *D. pigrum* pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas, un grupo heterogéneo de bacterias que producen lactato como principal metabolito a partir de glucosa [311]. Estas bacterias se han detectado principalmente en el tracto gastrointestinal, donde ejercen numerosas funciones beneficiosas para la salud humana [312]. Tanto es así que algunas bacterias de este grupo ya se han integrado en fórmulas probióticas para restaurar los perfiles de microbiota intestinal alterados [313]. Aunque *D. pigrum* se ha reportado como causa de diferentes infecciones [126–128], la colonización del tracto respiratorio superior por parte de esta especie se ha asociado más frecuentemente como factor protector frente a infecciones respiratorias, asma y exacerbaciones de enfermedades respiratorias crónicas [113, 129, 157, 174, 182, 183, 185, 314–319]. La asociación de esta bacteria a sujetos sanos en el primer y segundo estudio de esta tesis, así como su baja representación en los casos de ENI del tercer estudio, apuntan a que los perfiles de microbiota enriquecidos en *D. pigrum* podrían ser más resistentes a la infección invasiva por neumococo. Pruebas adicionales que apoyarían esta hipótesis son la menor gravedad de los pocos casos de ENI que presentaron un perfil de microbiota con elevada abundancia de *Dolosigranulum* en el primer estudio.

En esta tesis, además, se han observado correlaciones negativas entre los géneros *Dolosigranulum* y *Streptococcus* en el primer estudio y, aunque con tendencia a la significación estadística, también una correlación negativa entre OTUs asignadas a *D.*

*pigrum* y *S. pneumoniae* en el segundo estudio. Esto podría aludir a la existencia de interacciones antagónicas entre ambas bacterias en la nasofaringe de niños como posible mecanismo para la prevención de la ENI. Varios trabajos de investigación, muchos de ellos publicados durante el desarrollo de esta tesis doctoral, han observado asociaciones epidemiológicas negativas entre estas bacterias que concuerdan con los resultados presentados aquí [112, 115, 147, 156, 158, 174, 182, 183, 320, 321]. Asimismo, otros estudios experimentales han confirmado la competición de *D. pigrum* y *S. pneumoniae* *in vitro* [322]. Además, se han realizado estudios en modelos animales que avanza una futura aplicación clínica de estas observaciones; modelos de ratones *in vivo* han demostrado un aumento de la resistencia a la infección por neumococo en aquellos ratones en los que se administra *D. pigrum* de forma intranasal, así como una producción diferencial de citoquinas y una reducción del daño pulmonar [323, 324].

El papel de *Moraxella* en la salud respiratoria es mucho más controvertido; mientras que algunos autores indican que el género *Moraxella* tiene un impacto negativo en la salud respiratoria [125, 155, 173, 185, 314, 319, 323, 325–327], otros autores aluden a sus efectos beneficiosos en la estabilidad del microbioma respiratorio y en la prevención y reducción de la gravedad de enfermedades e infecciones respiratorias, especialmente en infecciones virales como la bronquiolitis [112, 157, 174, 178, 179, 183, 316, 318, 328, 329].

Parte de los resultados contradictorios podrían deberse a las diferencias en la edad de la primera colonización por parte de esta bacteria o a la no diferenciación de las especies de *Moraxella* en la mayoría de estudios de microbiota humana. La colonización del tracto respiratorio superior con *Moraxella* en el primer mes de vida parece estar relacionada con una mayor inestabilidad y mayor riesgo de infecciones respiratorias [113, 125, 325, 327], mientras que más allá de los dos o tres meses la dominancia de *Moraxella* en el tracto respiratorio superior se ha asociado con patrones de microbiota nasofaríngea más estables y equilibrados que son resistentes a la infección [112, 158, 318]. Esto indica que no sólo la colonización, sino el momento en que se produce la colonización y la abundancia de esta bacteria respecto a otras pueden tener influencia en la salud respiratoria del individuo. Otra explicación plausible podría radicar en el hecho de que se conocen dieciocho especies de *Moraxella* distintas y no todas tienen la misma capacidad de producir enfermedad [330, 331]. Dadas las limitaciones del gen ARNr 16S para la asignación de estas secuencias a nivel de especie [249, 269], muchos autores analizan sus datos a nivel de género, sin llegar a discriminar especies clásicamente patogénicas, como *Moraxella catarrhalis*, de otras especies de *Moraxella* comensales.

En nuestro primer estudio se observó una estrecha relación del género *Moraxella* con

la microbiota nasofaríngea de niños sanos. En cuanto a las especies de *Moraxella* detectadas, se identificaron, principalmente, *M. catarrhalis*, pero también otras especies sin un claro papel patógeno como *M. lincolnii*, *M. lacunata*, *M. nonliquefaciens*, etc. Aunque estas últimas presentaron mayor abundancia en controles sanos que en casos de ENI, no se realizaron pruebas de abundancia diferencial a nivel de especie que pudieran confirmar esta asociación. El segundo estudio, sin embargo, sí que arrojó más resultados sobre la posibilidad de que sean especies de *Moraxella* comensales, como *M. lincolnii*, las que ejerzan un rol beneficioso en la microbiota nasofaríngea infantil, al observarse una mayor abundancia de *M. lincolnii* en la microbiota nasofaríngea de niños sanos en comparación con la microbiota de niños con ENI.

*Moraxella lincolnii* se aisló por primera vez en el año 1980 de la nasofaringe de una niña de cinco años y, posteriormente, se ha ido aislando de muestras de vías respiratorias humanas [332]. Estudios longitudinales han confirmado la presencia de esta bacteria durante el desarrollo de la microbiota del tracto respiratorio superior en individuos sanos. Tan pronto como en la primera semana de vida ya se detecta *M. lincolnii* en la nasofaringe humana [121], y a los seis meses ya existen dos patrones de microbiota nasofaríngea dominados por dos especies de *Moraxella* distintas, una muy sugestiva de *M. catarrhalis*, y la otra correspondiente a *M. lincolnii* [112]. La relación de esta última especie de *Moraxella* con la salud del individuo no está clara, ya que no se dispone de mucha información sobre ella, aunque algunos trabajos describen a *M. lincolnii* como especie protectora frente a la infección respiratoria [183, 333] y nuestros resultados también apuntarían a que esta bacteria podría conferir protección frente a la ENI. Además, en un estudio *in vitro* reciente han identificado una actividad potente de *M. lincolnii* contra un patobionte clásico como *S. aureus* [334]. La correlación negativa que observamos entre las OTUs asignadas a *M. lincolnii* y *S. pneumoniae* en el segundo estudio sugiere que *M. lincolnii* también tendría actividad contra otras bacterias prevalentes en la nasofaringe, como neumococo, aunque se necesitan otro tipo de estudios para dilucidar el rol de *M. lincolnii* en las dinámicas de colonización de la nasofaringe y la susceptibilidad a infecciones.

Una OTU asignada a *Corynebacterium* spp. fue otra de las OTUs asociadas a la microbiota nasofaríngea de niños sanos en el segundo estudio, en comparación con la microbiota de niños con ENI. Su presencia se ha reportado con frecuencia en la literatura en combinación con *D. pigrum* en la nasofaringe de niños sanos, y en menor abundancia en niños con infección respiratoria y enfermedades como el asma o la fibrosis quística [112, 147, 156, 157, 174, 177, 316, 319, 329]. Esto es precisamente lo que ocurrió en el segundo estudio de esta tesis, en el que se observó una elevada correlación positiva entre los géneros *Dolosigranulum* y *Corynebacterium*. A su vez, estas bacterias exhibieron

correlaciones negativas con *Streptococcus* y *Haemophilus* que sugieren que *D. pigrum* y especies de *Corynebacterium* podrían presentar relaciones sinérgicas entre ellas, pero antagónicas con especies potencialmente patógenas como neumococo o *H. influenzae*. En este sentido, los pocos estudios publicados hasta el momento indican que una inhibición más robusta de neumococo por parte de *D. pigrum in vitro* requiere el co-cultivo de *D. pigrum* y especies de *Corynebacterium* [322], y confirma las observaciones reportadas *in vivo* en este segundo estudio. En el trabajo de Brugger *et al.* [322], además, observaron que diferentes especies de *Corynebacterium* incrementaban la tasa de crecimiento/supervivencia de *D. pigrum in vitro* y propusieron la eliminación de toxinas y/o la producción de metabolitos por parte de algunas especies de *Corynebacterium* como requerimientos necesarios para la supervivencia de *D. pigrum*. La existencia de estos mecanismos de interacción podría explicar la co-ocurrencia de ambas bacterias en estudios epidemiológicos de microbiota humana [322].

Bacterias típicas de la cavidad oral como los géneros *Veillonella*, *Gemella*, *Prevotella* o *Porphyromonas* [329, 335, 336] se asociaron al grupo de controles sanos en nuestro segundo estudio, y también a la vacunación neumocócica. Dado que el grupo de controles sanos presentó con tendencia estadística una mayor tasa de vacunación que los casos de ENI, esta asociación podría deberse, en realidad, al efecto de la vacuna. Además, el hecho de que en el primer estudio la microbiota de individuos sanos no se asociara a una mayor presencia de bacterias orales, con tasas de vacunación muy similares entre el grupo de ENI y el grupo de niños sanos, constituiría una prueba adicional de que estas bacterias están más relacionadas con la vacunación, tal y como se discute más adelante en una sección específica (**Página 133**).

La presencia de estas bacterias potencialmente beneficiosas en la nasofaringe de niños sanos coincidió a su vez con unos niveles elevados de riqueza y diversidad bacteriana, mayores que los observados en el grupo de niños con ENI sin exposición antibiótica previa y mayores que los observados en niños con infección respiratoria viral banal, aunque con diferencias no significativas. Estos resultados están en línea con la idea generalizada de que una microbiota equilibrada, resistente y resiliente a la infección se caracteriza por elevada riqueza y biodiversidad [130].

En oposición a esta microbiota nasofaríngea saludable enriquecida en bacterias potencialmente beneficiosas, se identificó una composición de microbiota nasofaríngea relacionada con la ENI. Ahora bien, esta infección bacteriana invasiva se asoció a dos perfiles de microbiota nasofaríngea distintos en función de un factor importante como es la exposición previa a antibióticos. La ENI es una infección bacteriana invasiva causada por *S.*



*pneumoniae* cuyo principal tratamiento consiste en la administración de antibióticos dirigidos contra esta bacteria, tal y como hemos explicado en la introducción de esta memoria. Se trata de una enfermedad en la que los síntomas son indistinguibles a los provocados por otros patógenos, y esto origina la necesidad de realizar estudios microbiológicos que permitan confirmar el agente etiológico causal para orientar el tratamiento. Sin embargo, dada la importancia de administrar un tratamiento antibiótico a tiempo asociado a una menor mortalidad en las manifestaciones clínicas más graves, como la sepsis o la meningitis [337, 338], frecuentemente se aplican tratamientos antibióticos empíricos previo a la confirmación microbiológica de la ENI [46, 47]. Además, en el caso de las neumonías, el diagnóstico etiológico sólo se realiza en aquellos pacientes con fracaso del tratamiento antibiótico oral o con una neumonía grave de inicio, debido al inconveniente de que el diagnóstico microbiológico precisa de la realización de pruebas diagnósticas complementarias invasivas [38, 39]. Por todos estos factores, una gran proporción de los sujetos con ENI incluidos en los trabajos de esta tesis han estado expuestos a antibióticos previamente a su reclutamiento en el estudio y a la consecuente recogida de la muestra nasofaríngea, si ésta no se había extraído con anterioridad con fines diagnósticos.

El diseño del primer estudio que compone esta tesis doctoral incluyó niños con una media de cuatro días de terapia antibiótica antes de la recogida de la muestra, de forma que en dicho estudio se caracterizó una microbiota asociada a la ENI, pero también a los cambios que se producen tras la administración del tratamiento antibiótico para su curación. En el segundo estudio, sin embargo, al incluir sólo pacientes sin exposición antibiótica previa o exposición hasta 24 horas (mediana de cero días), se pudo caracterizar la microbiota asociada específicamente a esta enfermedad.

A continuación se discute, principalmente, la composición de microbiota nasofaríngea asociada a la ENI en niños no expuestos a antibióticos ( $\leq 24$  horas), que hace referencia a los resultados del segundo estudio. Más adelante se discuten los hallazgos sobre los perfiles de microbiota nasofaríngea relacionados con la enfermedad y asociados al consumo antibiótico (**Página 134**), obtenidos en el primer y tercer estudio. Cabe destacar que no existieron diferencias en las manifestaciones clínicas de los pacientes incluidos en los tres estudios que pudieran contribuir a las discrepancias observadas en función de la toma de antibióticos; todos ellos presentaron como principal manifestación clínica la neumonía, seguida de otros cuadros clínicos menos frecuentes como meningitis y bacteriemia, de acuerdo con las características epidemiológicas de la ENI [3, 4].

Así, en el segundo estudio se observó que los niños con ENI sin exposición antibiótica previa presentaban una tasa de colonización neumocócica del 100%, significativamente

superior a la del grupo control sano, a la vez que una mayor carga de neumococo medida por PCR cuantitativa específica dirigida al gen *lytA* de neumococo. La colonización y el sobrecrecimiento de neumococo en nasofaringe preceden a la infección, como así se ha considerado clásicamente [1, 55] y como así también lo apoyarían los resultados derivados del segundo estudio de esta tesis.

Los resultados de los análisis de la secuenciación del gen ARNr 16S coincidieron con los hallados con la PCR cuantitativa específica dirigida contra neumococo; una microbiota nasofaríngea dominada por el género *Streptococcus*, que a niveles taxonómicos inferiores se correspondía principalmente con una OTU asignada a *S. pneumoniae*, se asoció a la ENI en ausencia de tratamiento antibiótico en el segundo estudio. Este hallazgo demuestra un sobrecrecimiento de neumococo en la nasofaringe de estos niños con ENI y confirma una relación directa y esperable de esta bacteria potencialmente patógena con la enfermedad. Sin embargo, y fruto del aumento de estudios de secuenciación masiva, se ha identificado un papel más amplio del género *Streptococcus*, y específicamente de *S. pneumoniae*, más allá de la ENI. Se han identificando perfiles de microbiota enriquecidos en este género y/o patobionte con mayor susceptibilidad y gravedad frente a infecciones respiratorias de distinta etiología [116, 155, 173, 178, 181, 185, 186, 327], así como también se han asociado con enfermedades respiratorias crónicas como el asma y bronquiectasias [116, 318, 325, 326]. Por tanto, la implicación del género *Streptococcus* y/o de este patobionte en múltiples procesos patológicos sugiere que éstos podrían tener un papel importante en la enfermedad respiratoria no sólo a través de las interacciones sinérgicas o antagónicas que establecen con el resto de la microbiota, sino también a través de la modulación del sistema inmune del huésped.

Otros factores relacionados con neumococo también se asociaron con el desarrollo de ENI en esta tesis, independientemente de la exposición antibiótica. El serotipado de neumococo permitió observar una mayor proporción de serotipos con alto potencial invasivo y/o cubiertos por la VNC13 en la nasofaringe de niños con ENI en comparación con la nasofaringe de niños sanos, tanto en el primer como en el segundo estudio. Este fenómeno podría explicarse por la presencia de una elevada proporción de casos de ENI que no estaban vacunados (39% en el primer estudio y 44% en el segundo estudio), por la importancia de la invasividad del serotipo como factor de susceptibilidad a la infección [70–72] y, también, por la existencia de fallos vacunales que se han descrito en la literatura [339].

Este sobrecrecimiento de *S. pneumoniae* en nasofaringe de niños con ENI del segundo estudio coincidió, a su vez, con la presencia de una microbiota poco rica y diversa, en concordancia con otros trabajos en niños con neumonía adquirida en la comunidad

[177, 185], neumonía por *Mycoplasma* [184, 186] o neumonías asociadas a la ventilación mecánica [340]. Sin embargo, también hay estudios que resaltan la variabilidad interindividual de la microbiota nasofaríngea y, por tanto, la imposibilidad de discernir un patrón uniforme de cambio en términos de diversidad alfa [158]. En los niños con ENI del segundo estudio también se reportó la ausencia y/o menor abundancia de especies potencialmente beneficiosas enriquecidas en una microbiota saludable, como *D. pigrum*, *M. lincolnii*, *Corynebacterium* spp. o *N. flavescens*, lo que corrobora que se ha producido una disbiosis importante asociada a la ENI en estos niños, caracterizada por la pérdida de especies comensales y la dominancia de una bacteria patógena.

Otro aspecto interesante asociado a la ENI en el segundo estudio de esta tesis es la mayor frecuencia de síntomas gastrointestinales en comparación con niños sanos y niños con infección respiratoria viral banal. Algunos trabajos han descrito hallazgos similares, especialmente en pacientes con neumonía bacteriémica [341, 342]. Es preocupante, además, el hecho de que un estudio reciente ha relacionado la aparición de estos síntomas gastrointestinales con una mayor mortalidad de la enfermedad a corto plazo, probablemente debido a un retraso en la administración del tratamiento antibiótico [343].

En este sentido, la comunidad científica aporta evidencias cada vez más sólidas sobre la existencia de una comunicación bidireccional del eje intestino-pulmón [344]; las alteraciones en la microbiota y función de las vías respiratorias se han relacionado con alteraciones en la funcionalidad y composición de la microbiota intestinal, y viceversa. Por ello sería interesante evaluar la existencia de alteraciones en la microbiota fecal asociadas a la ENI. En la literatura se ha reportado un mayor riesgo de neumonía neumocócica en un modelo de ratón *in vivo* cuya microbiota intestinal se había eliminado mediante el uso de antibióticos de amplio espectro [345]. Sin embargo, aunque esta publicación sugiere un rol de la microbiota intestinal en la protección frente a la infección invasiva por neumococo [345], este mayor riesgo también podría ser debido a cambios derivados del antibiótico en la microbiota respiratoria, que no se analizó en dicho estudio. Se necesitan, por tanto, trabajos que evalúen simultáneamente ambos tipos de muestras y su relación con la ENI.

En lo que concierne a los virus, en el segundo estudio se observó una mayor proporción de infección viral en los casos de ENI no expuestos a antibióticos en comparación con los controles sanos. Específicamente, VRS fue uno de los virus asociados significativamente a esta enfermedad. En la literatura se han observado asociaciones temporales entre la incidencia de ENI y la circulación de VRS, aunque con una fuerza de asociación variable entre diferentes poblaciones y regiones de estudio, así como temporadas de circulación del virus [346–348]. Además, en el estudio longitudinal de Brealey *et al.* [349], en el que

observaron las dinámicas de colonización bacteriana en la cavidad nasal, determinaron que VRS se relacionaba frecuentemente con un sobrecrecimiento de neumococo, más que con la nueva adquisición de esta bacteria [349]. En este sentido, se han descrito interacciones entre VRS y neumococo en modelos animales *in vivo* que indican que este virus sería capaz de modular la patogenicidad de *S. pneumoniae* tras la unión de la glicoproteína G de VRS a la proteína PBP1a de neumococo. Esta unión se ha relacionado con cambios en el transcriptoma de neumococo y la expresión de factores de virulencia como la neumolisina, que podrían conducir a un sobrecrecimiento patogénico de *S. pneumoniae* [350]. Por otra parte, aunque no significativo, también otros virus, como rinovirus o virus de la gripe, fueron más frecuentes en el grupo con ENI en el segundo estudio. Esto sugiere que no sólo VRS, sino también otros virus podrían tener un papel en el desarrollo de infección invasiva por neumococo en nuestro estudio, en línea con la literatura previa [160–162].

No obstante, estas interacciones víricas-bacterianas en nasofaringe, aunque importantes, no parecen ser suficientes para la progresión a infecciones bacterianas en el tracto respiratorio inferior e infecciones sistémicas graves. En este sentido, el grupo control del segundo estudio con infección viral confirmada en el tracto respiratorio superior presentaba cuadros clínicos leves y autolimitados, a pesar de mostrar una composición de microbiota nasofaríngea dominada por una OTU específica asignada a *H. influenzae*, una bacteria clásicamente patobionte que se ha relacionado en la literatura con cuadros infecciosos clínicamente graves [9, 34]. Sin embargo, cabe destacar, que nuestro estudio no ha analizado si esta relación podría ser a la inversa y una mayor riqueza de *H. influenzae* y otros patobiontes bacterianos podría asociarse a mayor gravedad de la infección viral, como sugieren otros trabajos [116, 178, 179].

La inclusión de este grupo con infección viral en el tracto respiratorio superior en el segundo estudio, además del grupo control sano y del grupo de casos de ENI, permitió identificar otras características importantes de la microbiota nasofaríngea relacionadas con la gravedad de las infecciones respiratorias.

En primer lugar, los análisis de diversidad beta identificaron una composición de microbiota nasofaríngea asociada a los niños con infección respiratoria viral banal con características intermedias entre los perfiles de microbiota de niños sanos y de niños hospitalizados con ENI, un hallazgo que confirmó la asociación de la microbiota bacteriana nasofaríngea con la gravedad de los síntomas y que está en línea con publicaciones de otros autores [116, 177, 178, 180, 182, 328, 351].

En segundo lugar, aunque no significativo, se observó una pérdida progresiva de riqueza

y diversidad de especies directamente proporcional a la gravedad de la infección. Este fenómeno también se ha descrito en el estudio de Teo *et al.* [177] en el que compararon la microbiota nasofaríngea de niños sanos, niños con infección del tracto respiratorio superior y niños con infección respiratoria de vías bajas de forma similar al segundo trabajo de esta tesis, lo que refuerza la idea de que estos cambios observados en la microbiota nasofaríngea son graduales y se relacionan directamente con la gravedad [177].

En tercer lugar, los pacientes con infección viral banal en el tracto respiratorio superior mantenían unos niveles de especies potencialmente beneficiosas menores que los controles sanos, pero mayores que los casos de ENI. Este hallazgo hace referencia, principalmente, a *D. pigrum*, pero también a *Corynebacterium* spp. o *N. flavescens*, aunque éstos últimos no fueron significativos. Conservar una baja abundancia de estas especies beneficiosas podría no ser suficiente para evitar la infección localizada en el tracto respiratorio superior, como ocurre en el grupo con infección viral sintomática de curso banal cuya microbiota estaba dominada por *H. influenzae*, pero sí para contener la extensión de bacterias con potencial patogénico desde nasofaringe a torrente sanguíneo o a vías respiratorias inferiores y evitar, así, el desarrollo de síndromes clínicos graves.

En conjunto, estos resultados sugieren que no se ha producido una disbiosis completa en los pacientes con infección leve. El mantenimiento de especies comensales podría ser clave para preservar cierta homeostasis ecológica en la nasofaringe cuando se producen perturbaciones en la microbiota nasofaríngea como la infección viral y/o el sobrecrecimiento de bacterias potencialmente patógenas.

Sin embargo, es difícil determinar si la presencia de una microbiota disbiótica favorece el sobrecrecimiento de *S. pneumoniae* y otras bacterias en la nasofaringe, así como la adquisición de virus respiratorios, o si bien la secuencia de estos factores es a la inversa y una microbiota disbiótica es, precisamente, el resultado de estos factores. Existe bibliografía en ambos sentidos, como se ha referido en la introducción. Nuestro diseño de estudio caso-control, aunque no ha permitido establecer la secuencia temporal de estos hechos, sí que ha permitido describir una fuerte asociación de la microbiota nasofaríngea con la ENI y como factor relacionado con la gravedad de las infecciones del tracto respiratorio. Además, también ha permitido demostrar la importancia de las diferencias detectadas en la microbiota nasofaríngea de acuerdo al estado de salud respiratoria en la correcta clasificación de los sujetos en su grupo de estudio, revelando así la utilidad de la microbiota nasofaríngea para el diagnóstico de la ENI.

De esta forma, la construcción de modelos de clasificación con el algoritmo Random

Forest en el segundo estudio permitió discriminar con precisión los casos graves de ENI no expuestos o mínimamente expuestos a antibióticos de los niños con infección respiratoria viral banal (área bajo la curva de 0.90) y, también, de los niños sanos (área bajo la curva de 0.86), únicamente teniendo en cuenta parámetros microbiológicos clásicos y de secuenciación masiva obtenidos de este tipo de muestra. Aunque clásicamente se ha descartado el uso de muestras del tracto respiratorio superior para el diagnóstico microbiológico de la ENI debido a la presencia de microbiota comensal que impedía diferenciar entre colonización e infección [35, 60], nuestros estudios apuntan a que se producen perturbaciones en la microbiota nasofaríngea de niños con ENI asociadas a la propia enfermedad que sí tienen valor diagnóstico.

La detección y cuantificación de neumococo fueron parámetros importantes con elevado poder discriminatorio en el segundo estudio; las tasas de colonización del 100% y la mayor carga de neumococo se asociaron con la ENI. Este hallazgo está en consonancia con el estudio de Bagget *et al.* [32] en el que hallaron una estrecha relación entre la mayor densidad neumocócica en nasofaringe y la neumonía neumocócica confirmada microbiológicamente en niños menores de cinco años. Bagget *et al.* [32] establecieron un umbral de 6.9  $\log_{10}$  copias/mL que permitió diferenciar estos casos de controles sanos con una sensibilidad del 64% y especificidad del 92% [32]. También en un estudio previo de nuestro grupo se determinó que la carga neumocócica en niños no expuestos a antibióticos tenía un elevado poder discriminatorio para diferenciar niños con ENI confirmada microbiológicamente de niños sanos, con una área bajo la curva de 0.82. En este caso un umbral de 6.5  $\log_{10}$  copias/mL arrojó una sensibilidad del 75% y una especificidad del 73.6% [33]. Otros estudios, aunque no arrojan datos sobre el rendimiento diagnóstico de las técnicas utilizadas, también han detectado cargas de patobiontes bacterianos más elevadas en nasofaringe de niños con neumonía en comparación con controles [352, 353]. No obstante, también se han reportado las dificultades de este marcador para diferenciar niños con neumonía, e incluso se han detectado mayores cargas neumocócicas en controles sanos que en casos con esta infección [35, 36]. Cabe destacar que estos últimos estudios utilizaron marcadores indirectos de neumonía neumocócica, como radiografías de tórax, y además los casos estaban expuestos con elevada frecuencia a antibióticos antes de la toma de la muestra. La colonización por neumococo depende, además, de múltiples circunstancias como la edad del individuo, factores genéticos o socioeconómicos, entre otros, que podrían contribuir a las diferencias observadas en los distintos estudios [1, 5, 57, 111, 166].

La determinación del potencial invasivo de *S. pneumoniae* fue otro de los factores con mayor importancia en la diferenciación de la ENI en el segundo estudio, incluso por encima de la carga. Dadas las diferencias en la virulencia de neumococo de acuerdo con este

polisacárido capsular [70–72], la incorporación de resultados de una PCR múltiple rápida para el tipado de neumococo podría contribuir a mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico microbiológico de la ENI en muestras no invasivas del tracto respiratorio superior. Esto es precisamente lo que sucede en el estudio de Brotons *et al.* [33], en el que la carga neumocócica en nasofaringe junto con la invasividad del serotipo y los niveles de hemoglobina tuvieron un mayor rendimiento que los tres factores por separado para el diagnóstico diferencial de la ENI en niños [33]. Sin embargo, se trata de un tipo de variable que se debe actualizar en consonancia con estudios epidemiológicos en la área geográfica, dada la existencia del fenómeno de reemplazo de los serotipos causantes de ENI y del intercambio de genes capsulares entre cepas de neumococo [4, 15, 18, 19, 71, 73, 354].

El aspecto más novedoso que aporta esta tesis en el diagnóstico de la ENI son las evidencias sobre la importancia de bacterias típicamente comensales, como los géneros *Dolosigranulum* y *Corynebacterium*, en la correcta clasificación de los sujetos con esta infección utilizando muestras no invasivas del tracto respiratorio superior. En el segundo estudio, una menor abundancia de estas bacterias en nasofaringe fue un marcador asociado a la infección invasiva por neumococo.

Previo al inicio de esta tesis no existía literatura que evaluase la utilidad de la caracterización de la microbiota del tracto superior con secuenciación masiva para el diagnóstico de infección respiratoria en niños. Hasta donde se sabe, tan solo existía un estudio en población adulta en el que se identificaron cinco marcadores bacterianos en orofaringe, incluyendo OTUs asignadas a *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus* spp., *Leptotrichia* spp., *Parascardovia* spp. y al orden *Gemellales*, que permitían discriminar pacientes con neumonía de pacientes sanos con elevada sensibilidad y especificidad [355]. En el estudio de Haak *et al.* [356], publicado con posterioridad, identificaron a los géneros *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Lawsonella* o *Streptococcus* como biomarcadores cuya abundancia diferencial en la nasofaringe permitía clasificar los pacientes adultos con neumonía de los sanos con una área bajo la curva de 0.81 [356]. Estas publicaciones corroboran la utilidad diagnóstica de la caracterización de la microbiota del tracto respiratorio superior, aunque las bacterias que permiten discriminar los pacientes con infección, a excepción de *Streptococcus*, son diferentes a las halladas en nuestro estudio. Probablemente, estas diferencias sean debidas a los distintos perfiles de microbiota observados en la microbiota nasofaríngea adulta en comparación con la infantil, así como a diferencias más específicas del nicho del tracto respiratorio superior analizado [112, 335, 336, 355–357]. Estas discrepancias también podrían explicarse por la existencia de una mayor diversidad de etiologías de la neumonía en el paciente adulto, en comparación con los niños en los que neumococo es la causa de más del 30% de estos episodios neumónicos [7, 358, 359].

Paralelamente a la realización de esta tesis, en el año 2018, se publicó el primer estudio en población pediátrica que pretendía discriminar pacientes con infección respiratoria de vías bajas (incluyendo neumonías, bronquiolitis y episodios de sibilancias) de sujetos sanos [183]. Utilizando parámetros de microbiota nasofaríngea bacteriana, infección viral y características individuales de los sujetos (lactancia materna, número de hermanos, historial médico, etc.) construyeron un modelo Random Forest con una área bajo la curva de 0.92. Marcadores bacterianos importantes que permitieron diferenciar los casos con infección fueron la mayor abundancia de *H. influenzae/haemolyticus*, *S. pneumoniae*, *Actinomyces* spp. y *Prevotella* spp., y la menor abundancia de *D. pigrum*, *Helcococcus* spp., *Corynebacterium propinquum* y *Moraxella* spp. [183]. Estos resultados son parcialmente similares a los presentados en esta tesis. No es de extrañar este parecido, ya que el principal agente causal de neumonía en niños es neumococo. Diferencias más específicas podrían deberse a la presencia de otros cuadros clínicos dentro de la infección respiratoria de vías bajas con ligeras diferencias en las estructuras microbianas, como la bronquiolitis que se asocia a mayor abundancia de *Haemophilus* en la literatura [178, 179, 360].

Las pruebas aportadas en esta tesis, así como también los estudios anteriores, apoyarían la hipótesis de que el desarrollo de infección por bacterias potencialmente patógenas que colonizan la nasofaringe, como *S. pneumoniae* o *H. influenzae*, podría tener un origen polimicrobiano, más que monomicrobiano. Este nuevo concepto sobrepasa la idea de los postulados de Koch de un único agente causal y plantea la posibilidad de que el diagnóstico microbiológico debiera actualizarse en consonancia [200].

El diagnóstico microbiológico de ENI es fundamental para establecer una terapia antibiótica apropiada y a tiempo, que se relaciona con una menor mortalidad de esta enfermedad y con un mejor pronóstico [337, 338]. Además, es especialmente interesante el hecho de que la microbiota nasofaríngea haya permitido discriminar en nuestro estudio aquellos pacientes con infección bacteriana potencialmente grave que requiere tratamiento antibiótico y hospitalización de aquellos pacientes con infección viral en el tracto respiratorio autolimitada y leve; la sintomatología de ambos cuadros clínicos puede ser difícil de distinguir en las primeras horas, ya que las infecciones invasivas causadas por patobiontes bacterianos como neumococo suelen iniciarse en el tracto respiratorio superior [361]. Nuestros resultados sugieren, por tanto, que esta podría constituir una línea de investigación importante para el desarrollo e implementación de técnicas diagnósticas basadas en microbiota que pudieran ayudar en la práctica clínica a la racionalización de antibióticos y recursos hospitalarios.

Sin embargo, la laboriosidad en la preparación de librerías, así como la lentitud, el elevado coste y grandes requerimientos computacionales de las tecnologías de secuenciación masiva



utilizadas hasta ahora para la caracterización de la microbiota humana, como los sistemas de Illumina, complican la aplicabilidad de este tipo de estudios en la práctica médica. La necesidad de acumular un elevado número de muestras para una mayor rentabilidad de la técnica en estos secuenciadores tradicionales también limita su utilidad. En este sentido, en los últimos años, la aparición de la tecnología de secuenciación en tiempo real de nanopore ha resuelto muchos de estos inconvenientes. Esta tecnología se ofrece como una alternativa menos laboriosa, más rápida y coste-efectiva [250, 251]. Especialmente, la aparición del secuenciador portátil MinION y las celdas de flujo tipo Flongle, que permiten el análisis de muestras individualmente a un bajo coste, podrían cambiar este panorama y mejorar la viabilidad de los estudios de microbiota humana para un uso clínico. Aunque escasos, algunos estudios ya han evaluado la implementación de esta tecnología para el diagnóstico etiológico temprano y la detección de resistencias en la práctica clínica en casos aislados [362–364].

Otro abordaje rápido que permitiría aproximar los estudios de microbiota humana a la práctica clínica para el diagnóstico de ENI podría constituir el diseño de un array molecular que incorpore como dianas la detección de neumococo y el tipo capsular, así como los virus respiratorios humanos y la carga de bacterias comensales y potencialmente patógenas en nasofaringe. Aunque existen arrays de diagnósticos *in vitro* orientados a la detección de bacterias y otros microorganismos que son causa frecuente de infección respiratoria [221], en la actualidad no existen arrays que incorporen entre sus dianas la detección y cuantificación de bacterias comensales respiratorias como *D. pigrum*.

Sin embargo, en otros campos más avanzados, como el de la microbiota intestinal, el progreso en el desarrollo de aplicaciones basadas en pruebas de microbiota está aún muy ralentizado, debido a diferentes problemas no resueltos, como por ejemplo el hecho de que los cambios taxonómicos en individuos con una misma enfermedad no son totalmente consistentes como consecuencia de diferencias en el procesamiento de las muestras, la extracción, secuenciación, análisis de datos, poblaciones de estudio, así como factores confusores como la dieta o los antibióticos [98, 197, 365]. Tampoco existe una composición taxonómica en individuos sanos claramente establecida, dada la elevada variabilidad entre individuos, y esto hace que la identificación de biomarcadores recaiga en la comparación de poblaciones de casos frente a controles sanos [366]. Por ello, el principal desafío asociado al diagnóstico basado en microbiota es la validación, que provoca la necesidad de acumular mayor número de datos sobre los perfiles de microbiota respiratoria asociados a estados de salud y enfermedad, así como a otras variables que puedan influir en su composición.

En esta tesis, precisamente, se identificaron otras variables como factores moduladores

importantes de la microbiota nasofaríngea en la infancia. Factores relacionados con la prevención y el tratamiento de la ENI, incluyendo la lactancia materna, la vacunación neumocócica y los antibióticos, se relacionaron con cambios significativos en la composición de microbiota nasofaríngea de estos niños.

En el primer estudio se identificó, con tendencia a la significación estadística, una asociación entre una duración de la lactancia materna inferior a la recomendada por la OMS (seis meses) y el desarrollo de ENI en niños con una mediana de edad de 40 meses. Este descubrimiento está en consonancia con los resultados de estudios previos en los que se observa un efecto protector de la lactancia materna hasta los seis meses que persiste durante los primeros años de vida del individuo, y que reduce no sólo la incidencia, sino también la gravedad de los episodios de infección respiratoria [83, 367].

En esta tesis doctoral, además, se han observado diferencias en la composición de la microbiota nasofaríngea de acuerdo con la lactancia materna. En el primer estudio se observó que el 90.0% de los controles sanos que presentaban una microbiota rica en *Dolosigranulum* y *Moraxella* habían sido alimentados con leche materna, en comparación con el 33.3% y el 60.0% de los controles sanos que presentaban una microbiota dominada por bacterias potencialmente patógenas incluyendo *Streptococcus* y *Staphylococcus-Haemophilus*, respectivamente. Por otro lado, en el segundo estudio, los análisis de correlación lineal también corroboraron la asociación de *Moraxella* con una duración de la lactancia materna mayor a seis meses de acuerdo a lo recomendado por la OMS [134], aunque posteriormente los análisis de abundancia diferencial no demostraron una densidad significativamente distinta de esta bacteria en función de este factor. Estas asociaciones, aunque no concluyentes, son sugerentes de que la lactancia materna podría estar relacionada con una composición de microbiota nasofaríngea más rica en especies beneficiosas, como *D. pigrum* y el género *Moraxella*. A su vez, estas bacterias presentaron correlaciones negativas con patobiontes bacterianos en los estudios de esta tesis.

En el segundo estudio también se observó que los niños alimentados con leche materna al menos durante seis meses presentaron menor abundancia de bacterias anaerobias en nasofaringe, como *Veillonella*, *Alloprevotella* y *Porphyromonas*. Éstos son géneros típicos de la microbiota de la cavidad oral [329, 335, 336]. Curiosamente, el aumento de estas bacterias más propias de la boca en la nasofaringe se ha relacionado en esta tesis y en otros trabajos, como se explicará más adelante (**Página 134**), con el uso de antibióticos para el tratamiento de la infección respiratoria. Así, el nicho ecológico vacío dejado por las bacterias susceptibles al antibiótico parece ser rápidamente reemplazado por bacterias orales [156, 183].

El mecanismo por el cual la lactancia materna se asocia a una composición de microbiota significativamente distinta es desconocido. Algunos autores sugieren que la lactancia materna podría ser la fuente de microorganismos beneficiosos para la salud humana al hallar bacterias comensales colonizadoras del tracto respiratorio, como *D. pigrum*, en la composición del calostro y también de la leche madura [129, 136]. En el caso de *Moraxella*, nosotros no analizamos muestras de leche materna para poder establecer una conexión con esta bacteria, pero la bibliografía previa sugiere que éste no es un género típico de este fluido corporal y que otros mecanismos serían más plausibles [135, 136]. Otros autores han planteado que los factores inmunológicos asociados a la leche materna, como la inmunoglobulina IgA secretora frente a patógenos específicos como neumococo, podrían contribuir indirectamente a la modificación de la microbiota nasofaríngea favoreciendo la colonización o sobrecrecimiento de aquellas bacterias con interacciones antagónicas con neumococo [368, 369]. Además, estos factores inmunológicos, e incluso la presencia de bacterias beneficiosas en la leche materna protectoras frente a la infección respiratoria, podrían relacionarse con una reducción en el consumo de antibióticos que son potentes moduladores de la microbiota respiratoria con efectos duraderos a largo plazo [83, 113, 116, 156, 183, 367]. Sin embargo, no se pudo confirmar una relación entre la lactancia materna y la exposición a antibióticos ya que no se recogió información sobre la exposición antibiótica en los meses previos de los sujetos incluidos en los estudios.

Nuestros resultados están en línea con la escasa literatura previa sobre el efecto de la lactancia materna en la microbiota nasofaríngea y en otros nichos ecológicos del tracto respiratorio superior. La leche materna se ha relacionado con la reducción de la abundancia de bacterias anaerobias orales y el aumento de bacterias beneficiosas [129, 370]. Aunque en estos trabajos las diferencias se detectaron en niños de hasta tres meses de edad, los resultados de esta tesis han identificado diferencias asociadas a la lactancia materna más allá de este punto temporal. En nuestro segundo estudio, las diferencias en la microbiota nasofaríngea de acuerdo al tipo de alimentación se observaron en una población de niños con una mediana de edad de 30-31 meses, lo que sugiere que los seis meses de duración de la lactancia recomendados por la OMS son claves para la determinación de cambios taxonómicos en las comunidades microbianas de la nasofaringe con persistencia a medio-largo plazo.

Sobre el efecto específico de la vacunación neumocócica en la microbiota nasofaríngea, numerosas publicaciones han reportado una reducción de la colonización por serotipos vacunales [13, 131, 142, 143]. Sin embargo, en el segundo estudio de esta tesis se identificó un impacto más amplio de la vacunación neumocócica en la diversidad y composición taxonómica de la microbiota nasofaríngea utilizando técnicas de secuenciación masiva.

Estos resultados son similares a los que presentan otros autores [148, 149], pero contradicen algunos trabajos que indican que la vacunación tiene un efecto directo sobre el patógeno diana y no en el resto de microbiota comensal [146, 147].

La vacunación con una o más dosis de VNC en el segundo estudio se asoció a elevados niveles de diversidad de la microbiota nasofaríngea, principalmente debido al aumento de géneros anaerobios orales como *Veillonella*, *Alloprevotella*, *Porphyromonas*, *Gemella* y *Granulicatella*. Se extrajeron conclusiones muy parecidas en el primer estudio que se realizó con secuenciación masiva para evaluar el efecto de la VNC7 en la diversidad y colonización bacteriana de la nasofaringe [148]. En dicho estudio, además de la reducción de serotipos de neumococo vacunales y el aumento de géneros anaerobios, la vacunación también se asoció a mayor abundancia de *Staphylococcus* y especies de estreptococos no neumocócicas.

Los resultados del segundo estudio de esta tesis, por tanto, refuerzan la idea de que el impacto de la vacunación neumocócica es más profundo que la esperable reducción de los serotipos de neumococo vacunales y sugieren que las VNC podrían inducir la repoblación del nicho ecológico vacío dejado por *S. pneumoniae* con otras especies bacterianas, como las especies que frecuentemente se detectan en nichos ecológicos adyacentes como la cavidad oral [329, 335, 336].

La importancia de los cambios descritos en la microbiota nasofaríngea tras la vacunación neumocócica, más allá de la reducción de la enfermedad por neumococo [6, 18, 371], es de interés. Algún estudio ha descrito como efecto colateral de la vacunación con VNC7 el aumento de las otitis media aguda causadas por *S. aureus* [372, 373], probablemente como consecuencia del aumento de *Staphylococcus* como colonizador tras la eliminación de su competidor [145]. *M. catarrhalis* y *H. influenzae* no tipable también han aumentado su frecuencia en otitis media aguda tras la introducción de VNC7 [374]. Además, la presencia de bacterias típicas de la cavidad oral en la microbiota nasofaríngea se ha descrito como factor de riesgo de otitis media. Estas bacterias también son causa de infecciones orofaciales, neumonías por aspiración e infecciones periodontales, entre otras infecciones [375], y se han relacionado con enfermedades crónicas como el alzhéimer, la artritis reumatoide y diferentes desórdenes metabólicos [376].

En línea con lo observado tras la vacunación neumocócica, en el tercer estudio de esta tesis se han demostrado claras diferencias en la composición de la microbiota nasofaríngea de niños hospitalizados con ENI en función de la exposición a antibióticos. Se identificaron mayores niveles de diversidad en la microbiota nasofaríngea de niños con ENI expuestos a antibióticos betalactámicos durante una mediana de cuatro días antes de la

---

recogida de la muestra en comparación con los no expuestos, lo que sugiere un incremento rápido de la diversidad bacteriana en el tracto respiratorio superior tras el consumo antibiótico.

Aunque de forma general el consumo de antibióticos se ha asociado a una reducción de la diversidad y de la carga bacteriana total, especialmente en la microbiota intestinal [48], nuestro estudio no es el primero en describir lo contrario. En el estudio longitudinal de Smith *et al.* [377] hallaron un incremento transitorio de la diversidad en el tercer día de tratamiento con betalactámicos que se normalizó entre los ocho y diez días [377], y en el estudio de Chonmaitree *et al.* [155] describieron un aumento de la diversidad en el séptimo día post-tratamiento antibiótico que se normalizó finalmente pasados catorce días [155]. En nuestro estudio, al no tratarse de un estudio longitudinal, no se pudo determinar si esta mayor diversidad asociada al consumo antibiótico tenía un carácter transitorio o por lo contrario podría instaurarse de forma persistente.

En este tercer estudio el aumento de la diversidad coincidió con una menor tasa de colonización (66.7%) y una menor carga de neumococo en nasofaringe medida por PCR cuantitativa. El análisis de 16S permitió no sólo confirmar la menor abundancia de ASVs asignadas a *Streptococcus* filogenéticamente cercanas a *S. pneumoniae* en el grupo expuesto a antibióticos, sino también demostrar una mayor abundancia de ASVs de *Streptococcus* filogenéticamente cercanas a estreptococos del grupo viridans, como *S. mitis*, *S. oralis* o *S. infantis*, y de bacterias más típicas de la cavidad oral que de la nasofaringe, incluyendo ASVs asignadas a especies de *Veillonella*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Lautropia*, *Alloprevotella*, *Rothia*, etc. Otros estudios también han descrito la pérdida de bacterias potencialmente patógenas y el aumento de bacterias anaerobias y/o gramnegativas orales en microbiota del tracto respiratorio superior tras el consumo antibiótico o asociado a éste [156, 183].

Curiosamente, en el primer estudio de esta tesis observamos una composición de microbiota nasofaríngea en los casos de ENI muy similar a la asociada al consumo antibiótico en este tercer estudio. Los casos de ENI presentaron niveles elevados de diversidad mayores que el grupo control sano, tasas de colonización por neumococo menores al 100% (64.3%) y similares a la de niños sanos (57.1%), sobrerrepresentación del género *Streptococcus*, pero con más del 40% de las secuencias asignadas a *S. mitis/S. oralis*, en vez de *S. pneumoniae*, y sobrerrepresentación de una gran variedad de bacterias orales como *Veillonella*, *Prevotella*, *Granulicatella*, *Alloprevotella*, *Porphyromonas*, *Rothia*, *Capnocytophaga* y *Alloprevotella*. Inicialmente se hipotetizó que esta mayor diversidad y abundancia de estreptococos del grupo viridans y de bacterias orales podría estar relacionada con un aumento de la permisividad por parte del sistema inmune a la colonización microbiana en los casos de

ENI [378]. Sin embargo, los casos de ENI del primer estudio estaban altamente expuestos a antibióticos (media de cuatro días) previo a la recogida de la muestra nasofaríngea. De esta forma, cuando en el segundo estudio sólo se analizaron casos de ENI sin exposición antibiótica o mínima exposición, la composición de microbiota nasofaríngea fue totalmente distinta. La visión conjunta de los tres estudios ha permitido concluir que los biomarcadores asociados a ENI en el primer estudio estarían más ligados al consumo antibiótico que a la propia enfermedad, y resaltan la importancia del antibiótico como factor confusor en los estudios de microbiota humana.

Es interesante, también, el hecho de que los cambios en la microbiota nasofaríngea asociados al consumo antibiótico en niños con ENI en el primer y tercer estudio son similares a los descritos en los niños vacunados con una o más dosis de la vacuna neumocócica en el segundo estudio de esta tesis y en el estudio de Biesbroek *et al.* [148]. Aunque con diferente mecanismo de actuación, la vacunación y los antibióticos probablemente conduzcan a cambios similares al eliminar a neumococo de la nasofaringe y desplazar las especies detectadas. Por tanto, estos cambios observados en el tercer estudio sugieren que rápidamente tras el inicio del tratamiento antibiótico y la eliminación de neumococo de la nasofaringe se produce una repoblación con bacterias más típicas de la cavidad oral que de la nasofaringe. Esto suscita interés sobre cómo se produce esa repoblación y el significado clínico de estos cambios.

La falta de higiene oral frecuentemente olvidada en niños hospitalizados se ha asociado con cargas bacterianas elevadas [379–381] que podrían contribuir a la migración de bacterias de la placa dental y de la cavidad oral al espacio vacío dejado por neumococo en nasofaringe tras la administración de antibióticos. Otras hipótesis plausibles serían la adquisición de bacterias vía partículas inhaladas o la preexistencia de estas bacterias en nasofaringe que se expandiesen tras la eliminación de neumococo.

Como hemos comentado, el significado clínico de estos cambios es incierto. Muchas de estas bacterias son comensales [329, 335, 336]. Los estreptococos del grupo viridans son causa frecuente de bacteriemia y endocarditis [382], aunque también se ha reportado su papel protector frente a la infección respiratoria recurrente [175, 383]. *Granulicatella*, *Veillonella*, *Prevotella* y *Porphyromonas*, entre otros, se han detectado frecuentemente en infecciones anaerobias mixtas en niños [375]. Géneros bacterianos orales como *Prevotella* o *Porphyromonas* también se han asociado con enfermedades periodontales y parecen tener un importante papel proinflamatorio relacionado a nivel sistémico con múltiples enfermedades; metabólicas, cardiovasculares, neurológicas, oncológicas, trastornos depresivos y también respiratorias, como la neumonía [376, 384]. Se ha observado una

elevada proporción de especies bacterianas orales en muestras de lavado broncoalveolar en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad en combinación con *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, lo que indica que bacterias orales y patobiontes podrían actuar conjuntamente en la patogénesis de ésta [385]. Asimismo, las elevadas cargas bacterianas de la placa dental y oral, así como la existencia de periodontitis, se han descrito como factores de riesgo para el desarrollo de neumonía en pacientes hospitalizados, lo que sugiere que estas bacterias orales también podrían tener un papel en complicaciones hospitalarias [381, 386].

Otro aspecto interesante es que muchas de las bacterias asociadas al consumo antibiótico en el tercer estudio se caracterizan por presentar resistencia a betalactámicos [387–390], una característica que podría explicar el aumento de estas poblaciones bacterianas a pesar del tratamiento antibiótico. También podría ser que el modo de vida en biofilm de muchas de ellas restringiera la penetración de los antibióticos [391]. Apoyando esta idea, se observó que los niños expuestos a antibióticos y hospitalizados durante una mediana de tres días en el tercer estudio presentaron mayores niveles de *Staphylococcus*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, géneros que engloban especies implicadas en infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria [392]. En el primer estudio, además, se observó que más de un 60% de las secuencias asignadas a *Staphylococcus* en los casos de ENI con una media de cuatro días de antibióticos se correspondían con *S. epidermidis*, una especie con elevada resistencia a penicilina y propensión a formar biofilms [393, 394].

La posibilidad de generar resistencias o seleccionar resistencias en bacterias *a priori* comensales es preocupante. Los análisis genómicos en los últimos años han señalado un rol importante de especies bacterianas comensales en el intercambio genético de resistencias a antimicrobianos y han demostrado que estas bacterias comensales actúan como reservorio de genes para especies más patógenas, como *S. pneumoniae* o *S. aureus* [52, 395]. También es preocupante el hecho de que algunas de estas bacterias orales gramnegativas, como *Prevotella* o *Porphyromonas*, podrían contribuir a la protección de especies de neumococo sensibles a penicilina mediante la liberación de betalactamasas, lo que podría estar ligado al origen de fallos antibióticos o contribuir a evoluciones tórpidas de la enfermedad [396].

Los resultados de esta tesis sugieren, por tanto, que debe profundizarse en el uso de terapias o estrategias destinadas a la modulación de una composición de microbiota equilibrada y saludable para la prevención de la ENI, así como también ver estas terapias como una oportunidad para conseguir un reemplazo con bacterias saludables tras las perturbaciones que se producen en la microbiota nasofaríngea asociadas a la toma de antibióticos o a la vacunación.

Los probióticos son definidos por la OMS como microorganismos vivos que consumidos en cantidades adecuadas ejercen efectos beneficiosos sobre el huésped que los consume [397]. Las evidencias sobre los efectos beneficiosos de los probióticos en la salud humana se han acumulado durante los últimos años, especialmente para la prevención y tratamiento de múltiples desórdenes metabólicos e intestinales cuyo desarrollo o manifestaciones clínicas están mediadas, en parte, por alteraciones en la microbiota humana [313].

Muchos de los probióticos actualmente comercializados y empleados en la práctica médica incluyen diferentes cepas de especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, especies que pertenecen a la familia de bacterias ácido lácticas y que forman parte de la microbiota intestinal de individuos sanos ejerciendo múltiples funciones beneficiosas [312].

Los efectos de estas especies probióticas también han sido evaluados en enfermedades respiratorias, como el asma o la fibrosis quística, y en infecciones respiratorias [398, 399]. En el año 2015, una revisión sistemática de Cochrane demostró que estos probióticos se han asociado con una reducción en el número y la duración de episodios de infección respiratoria aguda en el tracto respiratorio superior, así como con una reducción en el uso de antibióticos en comparación con los pacientes a los que se les administró placebo en lugar de probióticos [400]. Otras revisiones sistemáticas posteriores también han confirmado su utilidad [401]. Asimismo se han publicado estudios en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad que sugieren un efecto beneficioso de la administración simultánea de antibióticos para tratar la neumonía y probióticos para restaurar la microbiota intestinal normal en adultos. Se ha reportado que estos probióticos mejoran el curso clínico de la neumonía; reducen la duración de la taquipnea, fiebre o días de estancia hospitalaria y normalizan los niveles de biomarcadores inflamatorios [402, 403]. También estos probióticos podrían tener un rol protector en la neumonía asociada a ventilación mecánica [404]. Sin embargo, estas revisiones y meta-análisis concluyen que las evidencias aportadas hasta la fecha sobre el efecto protector de los probióticos frente a la infección respiratoria son de baja calidad, con estudios que presentan resultados contradictorios y pequeños tamaños de muestras.

Otro aspecto a considerar es el hecho de que los probióticos evaluados hasta ahora para la protección contra la infección respiratoria tienen como diana, principalmente, la microbiota intestinal, ya que estos estudios se han ideado en base a los conocimientos sobre las funciones que ejercen las bacterias intestinales de forma sistémica. Sin embargo, los estudios con secuenciación masiva de los últimos años, incluidos los trabajos presentados en esta tesis, señalan otras bacterias con posibles efectos beneficiosos más directos, al formar parte de la microbiota respiratoria comensal y relacionarse más estrechamente con la protección frente a enfermedad e infección en el tracto respiratorio. Algunas de estas



bacterias con potencial para actuar como probiótico para la infección respiratoria son *D. pigrum* o algunas especies de *Corynebacterium*, como *Corynebacterium pseudodiphthericum*. Los efectos beneficiosos de estas especies en la modulación del sistema inmune y la resistencia frente a patógenos ya se han demostrado en modelos de ratones *in vivo* [323, 324]. Sin embargo, cabe destacar que este campo de estudio está en una fase muy inicial y que no todas las cepas de *D. pigrum* o *C. pseudodiphthericum* presentan este efecto protector [323]. En relación con este aspecto, en el estudio de Brugger *et al.* [322] observaron una gran diversidad genética asociada a *D. pigrum* al comparar los genomas de diferentes cepas que podría ser indicativo de una gran diversidad funcional [322]. Además, el hecho de que *D. pigrum* se haya relacionado con infección en pacientes puntuales [126–128] hace sospechar que algunas cepas, aunque escasas, puedan presentar factores de virulencia. Por ello, es necesario continuar con la investigación y caracterización completa de estas bacterias que podrían representar una nueva generación de probióticos.

El uso de bacterias inactivadas y de sus componentes, en lugar de bacterias viables, es otra alternativa propuesta para la inmunomodulación en poblaciones de individuos en los que el uso de microorganismos vivos podría representar un daño potencial, como los niños más pequeños cuyo sistema inmunitario está aún en desarrollo [405]. Estas preparaciones de microorganismos inactivados y/o de sus componentes que confieren un beneficio para la salud del huésped son denominados postbióticos. En el estudio de Moyano *et al.* [323] se ha demostrado la utilidad de la administración de este tipo de preparaciones contra la infección por VRS y neumococo. En dicho estudio observaron que la administración intranasal de la pared celular purificada de una cepa de *D. pigrum* fue capaz de incrementar la respuesta inmune frente a estos patógenos, aunque con menor eficiencia que la cepa viva [323].

Los prebióticos, o ingredientes destinados al crecimiento selectivo de ciertos microorganismos beneficiosos para la salud humana, constituyen otra alternativa fiable para restaurar el equilibrio de la microbiota respiratoria y prevenir diferentes enfermedades [406].

Una correcta higiene oral es una estrategia sencilla, segura y económica que también podría tener un papel en la protección frente a la repoblación de la nasofaringe con bacterias potencialmente perjudiciales y resistentes a antibióticos o bacterias comensales atípicas. En términos ecológicos, las especies tienden a evitar las relaciones de competencia. De esta forma, si existe un alto grado de competencia por los recursos de un nicho ecológico determinado, estas bacterias tenderán a colonizar otros nichos con mayor disponibilidad de recursos aunque presenten características ligeramente distintas [407]. Por tanto, una correcta higiene oral, relacionada con la disminución de la colonización y carga bacteriana total [379, 408–410], podría contribuir a equilibrar la disponibilidad de recursos entre la

cavidad oral y la nasofaringe, y evitar la migración de bacterias orales al espacio libre dejado por neumococo y las bacterias susceptibles al antibiótico. Además, se sabe por literatura que una buena higiene oral se ha asociado con una menor incidencia de neumonía adquirida en la comunidad y también como un factor protector frente a infección nosocomial en adultos y niños hospitalizados [379, 381, 411, 412]. Esto sugiere que las bacterias orales podrían tener un papel en el desarrollo de neumonía y en complicaciones hospitalarias y apoya la continuidad de la investigación en esta línea. Estudios en el futuro deberán confirmar el mecanismo por el cual se produce la repoblación de la nasofaringe observada en la presente tesis y evaluar, así, la utilidad de esta estrategia para promover una repoblación saludable.

Finalmente, esta tesis presenta varias limitaciones. Para empezar, el diseño de estudio de los trabajos presentados sólo permite establecer relaciones de asociación, pero no de causalidad. Por otro lado, el tamaño reducido de la muestra puede haber contribuido a una menor potencia estadística para la detección de cambios biológicos más sutiles, como las diferencias en la riqueza y la diversidad bacteriana en función de la gravedad de la infección, o la asociación de los géneros *Moraxella* y *Dolosigranulum* con la lactancia materna. Sin embargo, la valiosa cohorte de pacientes con ENI confirmados microbiológicamente reclutados en una área con una baja incidencia de la enfermedad, así como la ausencia de estudios previos con secuenciación masiva que evalúen la relación de esta microbiota respiratoria con la ENI, pone en valor los resultados de esta investigación a pesar del tamaño muestral.

Otras limitaciones de los trabajos que componen esta tesis conciernen a la metodología empleada para el estudio de las comunidades microbianas que habitan la nasofaringe.

En primer lugar, la secuenciación del gen ARNr 16S y la PCR son técnicas con imposibilidad de discernir la viabilidad de las bacterias y virus detectados, así como tampoco pueden aportar datos directos sobre la funcionalidad de las comunidades bacterianas analizadas.

Además, se ha de considerar el hecho de que se han utilizado dos equipos de secuenciación diferentes; el primer estudio se realizó con la técnica de pirosecuenciación 454, sin embargo, la discontinuidad de esta plataforma y la aparición de sistemas de secuenciación más competitivos como Illumina promovió el cambio al secuenciador MiSeq (Illumina) en el segundo y tercer estudio. Esto podría reducir la comparabilidad de los estudios, dada la presencia de sesgos relacionados con la tecnología de secuenciación, aunque estos sesgos estarían más relacionados con los cebadores utilizados que con la propia tecnología.

Una limitación adicional es la modificación de los *pipelines* de análisis bioinformáticos

utilizados en el curso de este trabajo de investigación. Los desarrollos recientes en las tecnologías de secuenciación masiva han provocado un incremento exponencial de los nuevos métodos, algoritmos y herramientas computacionales para los análisis de este tipo de datos. Esto hace que la comunidad científica deba actualizarse periódicamente incorporando los avances en este campo.

En último lugar, la resolución taxonómica a nivel de especie del gen ARNr 16S es baja si se utilizan regiones hipervariables en vez del gen completo. Esto es especialmente cierto para la distinción de especies muy parecidas, como las especies estreptocócicas, y para los estudios en los que se utilizaron tecnologías de secuenciación de lecturas cortas, como MiSeq de Illumina, en los que se secuenciaron amplicones de las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S, y no tanto para las secuencias generadas con 454 GS FLX, que cubrían una región más larga del gen, la región V1-V4. A pesar de ello, se creyó conveniente asignar las secuencias hasta nivel de especie, dado que la identificación taxonómica de especie refuerza la relevancia clínica de los estudios de microbiota humana, y por ello se utilizaron programas para la asignación específicamente diseñados para la clasificación de lecturas cortas del gen ARNr 16S con elevados niveles de identidad o confianza. No sólo esto, sino que además se construyó un árbol filogenético para la asignación de las secuencias de *Streptococcus*, un género con especies muy parecidas, y los estudios específicos con PCR cuantitativa para neumococo permitieron confirmar los hallazgos en referencia con OTUs y ASVs asignadas a *Streptococcus*.



## 6. Conclusiones



1. *Dolosigranulum pigrum*, *Moraxella lincolnii* y *Corynebacterium* spp. son bacterias comensales asociadas a una microbiota nasofaríngea saludable rica y diversa con potencial para la prevención de la ENI en población pediátrica.
2. Existe un perfil de microbiota nasofaríngea asociado al desarrollo de ENI. Los niños con ENI presentan una microbiota disbiótica caracterizada por: 1) sobrecrecimiento de neumococo (con elevada frecuencia serotipos invasivos y vacunales), 2) baja riqueza y diversidad, 3) baja abundancia de bacterias potencialmente beneficiosas como *D. pigrum*, *M. lincolnii* y *Corynebacterium* spp. y 4) mayor proporción de coinfección viral en comparación con niños sanos.
3. El grado de desviación respecto a una microbiota nasofaríngea asociada a salud respiratoria está directamente relacionado con la gravedad de la infección respiratoria en niños. En los pacientes con infección respiratoria viral banal no se ha producido una disbiosis completa de la microbiota nasofaríngea y conservan la presencia de bacterias beneficiosas como *D. pigrum*, así como también niveles intermedios de riqueza y diversidad.
4. La composición de microbiota nasofaríngea tiene valor diagnóstico y permite diferenciar niños con ENI de niños con infección viral banal y de niños sanos.
5. La duración de la lactancia materna de acuerdo con las recomendaciones de la OMS tiene un efecto a medio-largo plazo en la composición de microbiota nasofaríngea infantil.
6. Una duración de la lactancia materna igual o superior a seis meses se relaciona con una menor abundancia de bacterias como *Veillonella*, *Alloprevotella* o *Porphyromonas* en la nasofaringe de niños.
7. Los niños vacunados con una o más dosis de vacunas neumocócicas conjugadas presentan una composición de microbiota nasofaríngea diversa caracterizada por el aumento de bacterias típicas de la cavidad oral.
8. El tratamiento antibiótico con betalactámicos se asocia a perturbaciones sustanciales en la nasofaringe de niños con ENI.
9. El tratamiento antibiótico es un factor confusor muy importante a tener en consideración en la interpretación de los estudios de microbiota humana.

10. Los niños con ENI expuestos a antibióticos presentan una menor abundancia de neumococo en la nasofaringe y mayor abundancia de estreptococos del grupo viridans, bacterias típicas de la cavidad oral y bacterias nosocomiales.
  
11. La vacunación y el uso previo de antibióticos dejan un vacío en el nicho ecológico de la nasofaringe en niños que es reemplazado de forma rápida por bacterias comensales o potencialmente patógenas. Ésta podría ser una oportunidad para implementar estrategias que promuevan el reemplazo por bacterias saludables.



## 7. Referencias



- 
- [1] Obaro S, Adegbola R. The pneumococcus: Carriage, disease and conjugate vaccines. *J Med Microbiol.* 2002 Feb;51(2):98-104. Disponible en: doi:10.1099/0022-1317-51-2-98.
- [2] Kaur R, Morris M, Pichichero ME. Epidemiology of Acute Otitis Media in the Postpneumococcal Conjugate Vaccine Era. *Pediatrics.* 2017 Sep;140(3):e20170181. Disponible en: doi:10.1542/PEDS.2017-0181.
- [3] De Sevilla MF, García-García JJ, Esteva C, Moraga F, Hernández S, Selva L, et al. Clinical Presentation of invasive pneumococcal disease in Spain in the era of heptavalent conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Feb;31(2):124-8. Disponible en: doi:10.1097/INF.0B013E318241D09E.
- [4] Izquierdo C, Ciruela P, Hernández S, García-García JJ, Esteva C, Moraga-Llop F, et al. Pneumococcal serotypes in children, clinical presentation and antimicrobial susceptibility in the PCV13 era. *Epidemiol Infect.* 2020 Nov;148(5):e279. Disponible en: doi:10.1017/S0950268820002708.
- [5] Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 2004 Mar;4(3):144-54. Disponible en: doi:10.1016/S1473-3099(04)00938-7.
- [6] Fitzwater SP, Chandran A, Santosham M, Johnson HL. The worldwide impact of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 May;31(5):501-8. Disponible en: doi:10.1097/INF.0B013E31824DE9F6.
- [7] 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators GBD. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018 Nov;18(11):1191-210. Disponible en: doi:10.1016/S1473-3099(18)30310-4.
- [8] Oordt-Speets AM, Bolijn R, van Hoorn RC, Bhavsar A, Kyaw MH. Global etiology of bacterial meningitis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2018 Jun;13(6):e0198772. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0198772.
- [9] Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A, Majumder A, Liu L, Chu Y, et al. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15. *Lancet Glob Heal.* 2018 Jul;6(7):e744-57. Disponible en: doi:10.1016/S2214-109X(18)30247-X.
- [10] Daniels CC, Rogers PD, Shelton CM. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. *J Pediatr Pharmacol Ther JPPT.* 2016 Jan;21(1):27-35. Disponible en: doi:10.5863/1551-6776-21.1.27.
- [11] Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large *cps* fragment from an oral streptococcus. *MBio.* 2020 May;11(3):e00937-20. Disponible en: doi:10.1128/MBIO.00937-20.
- [12] Pimenta F, Moiane B, Gertz RE, Chochua S, Snippes Vagnone PM, Lynfield R, et al. New Pneumococcal Serotype 15D. *J Clin Microbiol.* 2021 May;59(5):e00329-1. Disponible en: doi:10.1128/JCM.00329-21.
- [13] Fleming-Dutra K, Conklin L, Loo J, Knoll M, Park D, Kirk J, et al. Systematic review of the effect of pneumococcal conjugate vaccine dosing schedules on vaccine-type nasopharyngeal carriage. *Pediatr Infect Dis J.* 2014 Jan;33(SUPPL. 2):S152-60. Disponible en: doi:10.1097/INF.0000000000000083.
- [14] U S Food & Drug administration. Prevnar; 2018. Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/prevnar> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [15] Muñoz-Almagro C, Jordan I, Gene A, Latorre C, Garcia-Garcia J, Pallares R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan;46(2):174-82. Disponible en: doi:10.1086/524660.
-

- 
- [16] European Medicines Agency. Synflorix; 2021. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/synflorix> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [17] US Food & Drug administration. Prevnar 13; 2018. Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/prevnar-13> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [18] Savulescu C, Krizova P, Lepoutre A, Mereckiene J, Vestrheim DF, Ciruela P, et al. Effect of high-valency pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in children in SplDnet countries: an observational multicentre study. *Lancet Respir Med*. 2017 Aug;5(8):648-56. Disponible en: doi:10.1016/S2213-2600(17)30110-8.
- [19] Ludwig G, Garcia-Garcia S, Lanaspá M, Ciruela P, Esteva C, de Sevilla MF, et al. Serotype and clonal distribution dynamics of invasive pneumococcal strains after PCV13 introduction (2011-2016): Surveillance data from 23 sites in Catalonia, Spain. *PLoS One*. 2020 Feb;15(2). Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0228612.
- [20] US Food & Drug administration. VAXNEUVANCE; 2021. Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/vaxneuvance> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [21] US Food & Drug administration. Prevnar 20; 2021. Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/prevnar-20> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [22] Walkowski W, Bassett J, Bhalla M, Pfeifer BA, Ghanem ENB. Intranasal Vaccine Delivery Technology for Respiratory Tract Disease Application with a Special Emphasis on Pneumococcal Disease. *Vaccines*. 2021 Jun;9(6):589. Disponible en: doi:10.3390/VACCINES9060589.
- [23] Kuipers K, Jong WSP, van der Gaast-de Jongh CE, Houben D, van Opzeeland F, Simonetti E, et al. Th17-Mediated Cross Protection against Pneumococcal Carriage by Vaccination with a Variable Antigen. *Infect Immun*. 2017 Oct;85(10):e00281-17. Disponible en: doi:10.1128/IAI.00281-17.
- [24] Centers for Disease Control and Prevention. Invasive Pneumococcal Disease (IPD); 2021. Disponible en: <https://ndc.services.cdc.gov/case-definitions/invasive-pneumococcal-disease-2017/> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [25] Perez V, Caierão J, Fischer G, Dias C, D'Azevedo P. Pleural effusion with negative culture: a challenge for pneumococcal diagnosis in children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Oct;86(2):200-4. Disponible en: doi:10.1016/J.DIAGMICROBIO.2016.07.022.
- [26] Vernet G, Saha S, Satzke C, Burgess DH, Alderson M, Maisonneuve JF, et al. Laboratory-based diagnosis of pneumococcal pneumonia: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect*. 2011 May;17:1-13. Disponible en: doi:10.1111/J.1469-0691.2011.03496.X.
- [27] Ogami M, Hotomi M, Togawa A, Yamanaka N. A comparison of conventional and molecular microbiology in detecting differences in pneumococcal colonization in healthy children and children with upper respiratory illness. *Eur J Pediatr*. 2010 May;169(10):1221-5. Disponible en: doi:10.1007/S00431-010-1208-5.
- [28] Selva L, Benmessaoud R, Lanaspá M, Jroundi I, Moraleda C, Acacio S, et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type B by real-time PCR from dried blood spot samples among children with pneumonia: a useful approach for developing countries. *PLoS One*. 2013 Oct;8(10). Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0076970.
- [29] Alqayoudhi A, Nielsen M, O'Sullivan N, Corcoran M, Gavin PJ, Butler KM, et al. Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction Testing for *Streptococcus pneumoniae* in Pediatric Cerebrospinal Fluid Samples: A Diagnostic Accuracy Study of More Than 2000 Samples from 2004 to 2015. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Sep;36(9):833-6. Disponible en: doi:10.1097/INF.0000000000001608.
- [30] Cilloniz C, Liapikou A, Torres A. Advances in molecular diagnostic tests for pneumonia. *Curr Opin Pulm Med*. 2020 May;26(3):241-8. Disponible en: doi:10.1097/MCP.0000000000000668.

- 
- [31] World Health Organization. Pneumococcus; 2018. Disponible en: [https://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/WHO\\_SurveillanceVaccinePreventionTable\\_17\\_Pneumococcus\\_R2.pdf?ua=1](https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/WHO_SurveillanceVaccinePreventionTable_17_Pneumococcus_R2.pdf?ua=1) [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [32] Baggett HC, Watson NL, Knoll MD, Brooks WA, Feikin DR, Hammitt LL, et al. Density of Upper Respiratory Colonization With *Streptococcus pneumoniae* and Its Role in the Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia Among Children Aged <5 Years in the PERCH Study. *Clin Infect Dis*. 2017 Jun;64(15):S317-27. Disponible en: doi:10.1093/cid/cix100.
- [33] Brotons P, Bassat Q, Lanaspa M, Henares D, Perez-Arguello A, Madrid L, et al. Nasopharyngeal bacterial load as a marker for rapid and easy diagnosis of invasive pneumococcal disease in children from Mozambique. *PLoS One*. 2017 Sep;12(9):e0184762. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0184762.
- [34] Claassen-Weitz S, Lim KYL, Mullally C, Zar HJ, Nicol MP. The association between bacteria colonizing the upper respiratory tract and lower respiratory tract infection in young children: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Sep;27(9):1262-70. Disponible en: doi:10.1016/J.CMI.2021.05.034.
- [35] Pernica JM, Inch K, Alfaraidi H, Van Meer A, Carciumaru R, Luinstra K, et al. Assessment of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* colonization does not permit discrimination between Canadian children with viral and bacterial respiratory infection: a matched-cohort cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2021 May;21(1):1-7. Disponible en: doi:10.1186/S12879-021-06235-Z.
- [36] Piralam B, Prospero C, Thamthitawat S, Bunthi C, Sawatwong P, Sangwichian O, et al. Pneumococcal colonization prevalence and density among Thai children with severe pneumonia and community controls. *PLoS One*. 2020 Apr;15(4):e0232151. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0232151.
- [37] Mermond S, Zurawski V, D'Ortenzio E, Driscoll AJ, DeLuca AN, Deloria-Knoll M, et al. Lower Respiratory Infections Among Hospitalized Children in New Caledonia: A Pilot Study for the Pneumonia Etiology Research for Child Health Project. *Clin Infect Dis*. 2012 Apr;54(SUPPL. 2):S180-9. Disponible en: doi:10.1093/CID/CIR1070.
- [38] Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, et al. The Management of Community-Acquired Pneumonia in Infants and Children Older Than 3 Months of Age: Clinical Practice Guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2011 Oct;53(7):e25-76. Disponible en: doi:10.1093/CID/CIR531.
- [39] Harris M, Clark J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, McKean M, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: Update 2011. *Thorax*. 2011 Oct;66(SUPPL. 2):ii1-ii23. Disponible en: doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200598.
- [40] Lagos R, Muoz A, Valenzuela M, Heitmann I, Levine M. Population-based surveillance for hospitalized and ambulatory pediatric invasive pneumococcal disease in Santiago, Chile. *Pediatr Infect Dis J*. 2002 Dec;21(12):1115-23. Disponible en: doi:10.1097/00006454-200212000-00006.
- [41] Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*. 1929 Jun;10(3):226-36. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [42] Hansman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus. *Lancet*. 1967 Jul;290(7509):264-5. Disponible en: doi:10.1016/S0140-6736(67)92346-X.
- [43] Abraham EP. Cephalosporins 1945–1986. *Drugs*. 1987 Oct;34(SUPPL. 2):1-14. Disponible en: doi:10.2165/00003495-198700342-00003.
-

- 
- [44] von Specht M, García Gabarrot G, Mollerach M, Bonofiglio L, Gaggioli P, Kaufman S, et al. Resistance to  $\beta$ -lactams in *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Argent Microbiol*. 2021 Jul;53(3):266-71. Disponible en: doi:10.1016/J.RAM.2021.02.007.
- [45] Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Mar;32(2):149-67. Disponible en: doi:10.1111/J.1574-6976.2007.00094.X.
- [46] National Institute for Health and Care Excellence. Meningitis (bacterial) and meningococcal septicaemia in under 16s: recognition, diagnosis and management Clinical guideline; 2015. Disponible en: [www.nice.org.uk/guidance/cg102](http://www.nice.org.uk/guidance/cg102) [Citado el 18 de octubre de 2021].
- [47] Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, Agus MSD, Flori HR, Inwald DP, et al. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. *Pediatr Crit Care Med*. 2020 Feb;21(2):e52-e106. Disponible en: doi:10.1097/PCC.0000000000002198.
- [48] Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev*. 2017 Sep;279(1):90-105. Disponible en: doi:10.1111/imr.12563.
- [49] World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed; 2017. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [50] Zigelboim S, Tomasz A. Penicillin-binding proteins of multiply antibiotic-resistant South African strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980 Mar;17(3):434-42. Disponible en: doi:10.1128/AAC.17.3.434.
- [51] Dowson CG, Hutchison A, Brannigan JA, George RC, Hansman D, Linares J, et al. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(22):8842-6. Disponible en: doi:10.1073/PNAS.86.22.8842.
- [52] Chaguza C, Cornick JE, Everett DB. Mechanisms and impact of genetic recombination in the evolution of *Streptococcus pneumoniae*. *Comput Struct Biotechnol J*. 2015 Apr;13:241-7. Disponible en: doi:10.1016/J.CSBJ.2015.03.007.
- [53] Donnelly J, Baddley J, Wang H. Antibiotic utilization for acute respiratory tract infections in U.S. emergency departments. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Mar;58(3):1451-7. Disponible en: doi:10.1128/AAC.02039-13.
- [54] Jackson C, Hsia Y, Bielicki JA, Ellis S, Stephens P, Wong ICK, et al. Estimating global trends in total and childhood antibiotic consumption, 2011-2015. *BMJ Glob Heal*. 2019 Feb;4(1):e001241. Disponible en: doi:10.1136/BMJGH-2018-001241.
- [55] Gray BM, Converse GM, Dillon HC. Epidemiologic Studies of *Streptococcus pneumoniae* in Infants: Acquisition, Carriage, and Infection during the First 24 Months of Life. *J Infect Dis*. 1980 Dec;142(6):923-33. Disponible en: doi:10.1093/INFDIS/142.6.923.
- [56] Dube FS, Ramjith J, Gardner-Lubbe S, Nduru P, Robberts FJL, Wolter N, et al. Longitudinal characterization of nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* in a South African birth cohort post 13-valent pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Sci Reports* 2018 81. 2018 Aug;8(1):1-9. Disponible en: doi:10.1038/s41598-018-30345-5.
- [57] Murad C, Dunne EM, Sudigdoadi S, Fadlyana E, Tarigan R, Pell CL, et al. Pneumococcal carriage, density, and co-colonization dynamics: A longitudinal study in Indonesian infants. *Int J Infect Dis*. 2019 Sep;86:73-81. Disponible en: doi:10.1016/J.IJID.2019.06.024.
- [58] Snieszko SF. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J Fish Biol*. 1974 Mar;6(2):197-208. Disponible en: doi:10.1111/J.1095-8649.1974.TB04537.X.
-

- 
- [59] Bernardo-Cravo AP, Schmeller DS, Chatzinotas A, Vredenburg VT, Loyau A. Environmental Factors and Host Microbiomes Shape Host–Pathogen Dynamics. *Trends Parasitol.* 2020 Jul;36(7):616-33. Disponible en: doi:10.1016/J.PT.2020.04.010.
- [60] Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol.* 2016 Feb;78:481-504. Disponible en: doi:10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021115-105238.
- [61] Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2020 Sep;19(1):55-71. Disponible en: doi:10.1038/S41579-020-0433-9.
- [62] Kumpitsch C, Koskinen K, Schöpf V, Moissl-Eichinger C. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biol.* 2019 Nov;17(1):87. Disponible en: doi:10.1186/s12915-019-0703-z.
- [63] Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Apr;6(4):288-301. Disponible en: doi:10.1038/nrmicro1871.
- [64] McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P, Briles DE. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect Immun.* 1991 Jan;59(1):222-8. Disponible en: doi:10.1128/IAI.59.1.222-228.1991.
- [65] Kilian M, Mestecky J, Schrohenloher RE. Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect Immun.* 1979 Oct;26(1):143-9. Disponible en: doi:10.1128/IAI.26.1.143-149.1979.
- [66] Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D, Paton JC. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1989 Jul;57(7):2037-42. Disponible en: doi:10.1128/IAI.57.7.2037-2042.1989.
- [67] Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, Paton JC, Boulnois GJ, Andrew PW, et al. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis.* 1995 Jul;172(1):119-23. Disponible en: doi:10.1093/INFDIS/172.1.119.
- [68] Kim JO, Romero-Steiner S, Skov Sørensen UB, Blom J, Carvalho M, Barnard S, et al. Relationship between Cell Surface Carbohydrates and Intrastrain Variation on Opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1999 May;67(5):2327-33. Disponible en: doi:10.1128/IAI.67.5.2327-2333.1999.
- [69] Sørensen UBS, Henrichsen J, Chen HC, Szu SC. Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb Pathog.* 1990 May;8(5):325-34. Disponible en: doi:10.1016/0882-4010(90)90091-4.
- [70] Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J Infect Dis.* 2003 May;187(9):1424-32. Disponible en: doi:10.1086/374624.
- [71] del Amo E, Selva L, de Sevilla MF, Ciruela P, Brotons P, Triviño M, et al. Estimation of the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children by the use of direct capsular typing in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 Mar;34(4):705-11. Disponible en: doi:10.1007/s10096-014-2280-y.
- [72] Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F, Diggle L, Gupta S, Maiden MC, et al. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J Infect Dis.* 2006 Sep;194(5):682-8. Disponible en: doi:10.1086/505710.
- [73] Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg.* 1928 Jan;27(2):113-59. Disponible en: doi:10.1017/S0022172400031879.
-

- [74] Marks L, Reddinger R, Hakansson A. High levels of genetic recombination during nasopharyngeal carriage and biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio*. 2012 Sep;3(5):e00200-12. Disponible en: doi:10.1128/MBIO.00200-12.
- [75] European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease - Annual Epidemiological Report for 2017; 2019. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/invasive-pneumococcal-disease-annual-epidemiological-report-2017> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [76] McMichael A, Simon AK, Hollander GA. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2015;282:20143085. Disponible en: doi:10.1098/rspb.2014.3085.
- [77] Muñoz-Almagro C, Bautista C, Arias MT, Boixeda R, Del Amo E, Borrás C, et al. High prevalence of genetically-determined mannose binding lectin deficiency in young children with invasive pneumococcal disease. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Oct;20(10):O745-52. Disponible en: doi:10.1111/1469-0691.12615.
- [78] Ramsay, M. Chapter 25: Pneumococcal. In: Immunisation against Infectious Diseases. England: UK Health Security Agency; 2021. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/pneumococcal-the-green-book-chapter-25> [Citado el 18 de octubre de 2021].
- [79] Kim PE, Musher DM, Glezen WP, Barradas MCR, Nahm WK, Wright CE. Association of Invasive Pneumococcal Disease with Season, Atmospheric Conditions, Air Pollution, and the Isolation of Respiratory Viruses. *Clin Infect Dis*. 1996 Jan;22(1):100-6. Disponible en: doi:10.1093/CLINIDS/22.1.100.
- [80] Sahuquillo-Arce JM, Ibáñez-Martínez E, Hernández-Cabezas A, Ruiz-Gaitán A, Falomir-Salcedo P, Menéndez R, et al. Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of *Streptococcus pneumoniae* infections. *ERJ Open Res*. 2017 Oct;3(4):00014-2017. Disponible en: doi:10.1183/23120541.00014-2017.
- [81] Hjuler T, Wohlfahrt J, Simonsen J, Kältoft M, Koch A, Kamper-Jørgensen M, et al. Perinatal and crowding-related risk factors for invasive pneumococcal disease in infants and young children: a population-based case-control study. *Clin Infect Dis*. 2007 Apr;44(8):1051-6. Disponible en: doi:10.1086/512814.
- [82] Feemster K, Li Y, Localio A, Shults J, Edelstein P, Lautenbach E, et al. Risk of invasive pneumococcal disease varies by neighbourhood characteristics: implications for prevention policies. *Epidemiol Infect*. 2013 Aug;141(8):1679-89. Disponible en: doi:10.1017/S095026881200235X.
- [83] Cushing AH, Samet JM, Lambert WE, Skipper BJ, Hunt WC, Young SA, et al. Breastfeeding Reduces Risk of Respiratory Illness in Infants. *Am J Epidemiol*. 1998 May;147(9):863-70. Disponible en: doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A009540.
- [84] Gessner BD, Ussery XT, Parkinson AJ, Breiman RF. Risk factors for invasive disease caused by *Streptococcus pneumoniae* among Alaska native children younger than two years of age. *Pediatr Infect Dis J*. 1995 Feb;14(2):123-8. Disponible en: doi:10.1097/00006454-199502000-00008.
- [85] Scott JAG, Brooks WA, Peiris JSM, Holtzman D, Mulhollan EK. Pneumonia research to reduce childhood mortality in the developing world. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1291-300. Disponible en: doi:10.1172/JCI33947.
- [86] Ekka JP, Uorti N, Utler ACB, Onica M, Arley MF, Arrison EHH, et al. Cigarette Smoking and Invasive Pneumococcal Disease. *N Engl J Med*. 2009 Aug;13(2):68-9. Disponible en: doi:10.1056/NEJM200003093421002.
- [87] Whipps J, Lewis K, Cooke R. Mycoparasitism and plant disease control. In: Burge M, editor. Fungi in Biological Control Systems. Manchester, Reino Unido: Manchester University Press; 1988. p. 161-87.



- [88] Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020 Jun;8(1):1-22. Disponible en: doi:10.1186/S40168-020-00875-0.
- [89] Tierney B, Yang Z, Lubber J, Beaudin M, Wibowo M, Baek C, et al. The Landscape of Genetic Content in the Gut and Oral Human Microbiome. *Cell Host Microbe*. 2019 Aug;26(2):283-95.e8. Disponible en: doi:10.1016/J.CHOM.2019.07.008.
- [90] Moissl-Eichinger C, Probst AJ, Birarda G, Auerbach A, Koskinen K, Wolf P, et al. Human age and skin physiology shape diversity and abundance of Archaea on skin. *Sci Reports*. 2017 Jun;7(1):1-10. Disponible en: doi:10.1038/s41598-017-04197-4.
- [91] Lokmer A, Cian A, Froment A, Gantois N, Viscogliosi E, Chabé M, et al. Use of shotgun metagenomics for the identification of protozoa in the gut microbiota of healthy individuals from worldwide populations with various industrialization levels. *PLoS One*. 2019 Feb;14(2):e0211139. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0211139.
- [92] Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*. 2017 Nov;5(1):153. Disponible en: doi:10.1186/S40168-017-0373-4.
- [93] Kumata R, Ito J, Takahashi K, Suzuki T, Sato K. A tissue level atlas of the healthy human virome. *BMC Biol*. 2020 Jun;18(1):55. Disponible en: doi:10.1186/S12915-020-00785-5.
- [94] Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016 Jan;164(3):337-40. Disponible en: doi:10.1016/J.CELL.2016.01.013.
- [95] Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr*. 1972 Dec;25(12):1292-4. Disponible en: doi:10.1093/AJCN/25.12.1292.
- [96] Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, et al. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Dec;104(49):19428-33. Disponible en: doi:10.1073/PNAS.0709013104.
- [97] Grice EA, Segre JA. The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012 Sep;13:151-70. Disponible en: doi:10.1146/ANNUREV-GENOM-090711-163814.
- [98] Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy N. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug;21(29):8787-803. Disponible en: doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787.
- [99] Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Mar;9(4):244-53. Disponible en: doi:10.1038/nrmicro2537.
- [100] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar;108(SUPPL. 1):4680-7. Disponible en: doi:10.1073/pnas.1002611107.
- [101] Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. *PLoS One*. 2010 Jan;5(1):e8578. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0008578.
- [102] Bogaert D, Keijsers B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, van Gils E, et al. Variability and Diversity of Nasopharyngeal Microbiota in Children: A Metagenomic Analysis. *PLoS One*. 2011 Feb;6(2):e17035. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0017035.
- [103] Françoise A, Héry-Arnaud G. The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes*. 2020 May;11(5):536. Disponible en: doi:10.3390/GENES11050536.
- [104] OpenStax College. Anatomy & Physiology. vol. 3. Textbook equity ed. Houston, Texas: Openstax College; 2013. Disponible en: <https://textbookequity.org/Textbooks/anatomy+phys+vo13.pdf> [Citado el 10 de febrero de 2022].

- [105] Burky EL, Smillie WG. Nasopharyngeal flora in health and during respiratory disease in isolated communities in Alabama and Labrador. *J Exp Med.* 1929 Nov;50(5):643-63. Disponible en: doi:10.1084/JEM.50.5.643.
- [106] Willard CY, Hansen AE. Bacterial Flora of the Nasopharynx in Children: Influence of Respiratory Infections and Previous Antimicrobial Therapy. *AMA J Dis Child.* 1959 Mar;97(3):318-25. Disponible en: doi:10.1001/ARCHPEDI.1959.02070010320010.
- [107] Ho Man W, de Steenhuijsen Pipers WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol.* 2017 May;15(5):259-70. Disponible en: doi:10.1038/nrmicro.2017.14.
- [108] Hutchinson G. Concluding remarks. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1958;22:415-27. Disponible en: doi:10.1101/SQB.1957.022.01.039.
- [109] Polechová J, Storch D. Ecological Niche. In: Jørgensen S, Fath B, editors. *Encyclopedia of Ecology.* 2nd ed. Oxford, England: Academic Press; 2008. p. 1088-97.
- [110] Jochum L, Stecher B. Label or Concept – What Is a Pathobiont? *Trends Microbiol.* 2020 Oct;28(10):789-92. Disponible en: doi:10.1016/J.TIM.2020.04.011.
- [111] García-Rodríguez JÁ, Fresnadillo Martínez MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Dec;50(SUPPL. 2):59-73. Disponible en: doi:10.1093/JAC/DKF506.
- [112] Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EAM, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJB, et al. Early Respiratory Microbiota Composition Determines Bacterial Succession Patterns and Respiratory Health in Children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Dec;190(11):1283-92. Disponible en: doi:10.1164/rccm.201407-1240OC.
- [113] Bosch AATM, De Steenhuijsen Pipers WAA, Van Houten MA, Chu MLJN, Biesbroek G, Kool J, et al. Maturation of the infant respiratory microbiota, environmental drivers, and health consequences. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Dec;196(12):1582-90. Disponible en: doi:10.1164/rccm.201703-0554OC.
- [114] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nat.* 2012 May;486(7402):222-7. Disponible en: doi:10.1038/NATURE11053.
- [115] Man WH, Scheltema NM, Clerc M, van Houten MA, Nibbelke EE, Achten NB, et al. Infant respiratory syncytial virus prophylaxis and nasopharyngeal microbiota until 6 years of life: a subanalysis of the MAKI randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2020 Oct;8(10):1022-31. Disponible en: doi:10.1016/S2213-2600(19)30470-9.
- [116] Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M, Troy N, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe.* 2015 May;17(5):704-15. Disponible en: doi:10.1016/j.chom.2015.03.008.
- [117] Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med.* 2014 May;6(237):237ra65. Disponible en: doi:10.1126/SCITRANSLMED.3008599.
- [118] Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Reports.* 2016 Mar;6(1):1-13. Disponible en: doi:10.1038/srep23129.
- [119] de Goffau MC, Lager S, Sovio U, Gaccioli F, Cook E, Peacock SJ, et al. Human placenta has no microbiome but can harbour potential pathogens. *Nature.* 2019 Aug;572(7769):329-34. Disponible en: doi:10.1038/S41586-019-1451-5.
- [120] Lauder AP, Roche AM, Sherrill-Mix S, Bailey A, Laughlin AL, Bittinger K, et al. Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome.* 2016 Jun;4(1):1-11. Disponible en: doi:10.1186/S40168-016-0172-3.

- 
- [121] Bosch AATM, Levin E, van Houten MA, Hasrat R, Kalkman G, Biesbroek G, et al. Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy is Affected by Mode of Delivery. *EBioMedicine*. 2016 Jul;9:336-45. Disponible en: doi:10.1016/j.ebiom.2016.05.031.
- [122] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun;107(26):11971-5. Disponible en: doi:10.1073/pnas.1002601107.
- [123] Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007 Oct;449(7164):811-8. Disponible en: doi:10.1038/nature06245.
- [124] Franzosa EA, Huang K, Meadow JF, Gevers D, Lemon KP, Bohannan BJM, et al. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Jun;112(22):E2930-8. Disponible en: doi:10.1073/PNAS.1423854112.
- [125] Toivonen L, Hasegawa K, Waris M, Ajami NJ, Petrosino JF, Camargo CA, et al. Early nasal microbiota and acute respiratory infections during the first years of life. *Thorax*. 2019 Jun;74(6):592-9. Disponible en: doi:10.1136/thoraxjnl-2018-212629.
- [126] Ding T, Song T, Zhou B, Geber A, Ma Y, Zhang L, et al. Microbial composition of the human nasopharynx varies according to influenza virus type and vaccination status. *MBio*. 2019 Jul;10(4):e01296-19. Disponible en: doi:10.1128/MBIO.01296-19.
- [127] Laclaire L, Facklam R. Antimicrobial Susceptibility and Clinical Sources of *Dolosigranulum pigrum* Cultures. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jul;44(7):2001-3. Disponible en: doi:10.1128/AAC.44.7.2001-2003.2000.
- [128] Lécuyer H, Audibert J, Bobigny A, Eckert C, Janni re-Nartey C, Buu-Ho i A, et al. *Dolosigranulum pigrum* causing nosocomial pneumonia and septicemia. *J Clin Microbiol*. 2007 Oct;45(10):3474-5. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01373-07.
- [129] Biesbroek G, Bosch AATM, Wang X, Keijser BJJ, Veenhoven RH, Sanders EAM, et al. The impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Aug;190(3):298-308. Disponible en: doi:10.1164/rccm.201401-0073OC.
- [130] Relman DA. The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutr Rev*. 2012 Aug;70(SUPPL. 1):S2-9. Disponible en: doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00489.x.
- [131] Sun Y, Sundell J. Early Daycare Attendance Increase the Risk for Respiratory Infections and Asthma of Children. *J Asthma*. 2011 Oct;48(8):790-6. Disponible en: doi:10.3109/02770903.2011.604884.
- [132] Hooks KB, O'Malley MA. Dysbiosis and its discontents. *MBio*. 2017 Sep;8(5):e01492-17. Disponible en: doi:10.1128/mBio.01492-17.
- [133] Hennet T, Borsig L. Breastfed at Tiffany's. *Trends Biochem Sci*. 2016 Jun;41(6):508-18. Disponible en: doi:10.1016/j.tibs.2016.02.008.
- [134] World Health Organization. Breastfeeding; 2016. Disponible en: <https://www.who.int/western-pacific/health-topics/breastfeeding> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [135] Selma-Royo M, Lerma JC, Cort Es-Mac E, Collado MC. Human milk microbiome: From actual knowledge to future perspective. *Semin Perinatol*. 2021 Oct;46(6):151450. Disponible en: doi:10.1016/j.semperi.2021.151450.
- [136] Drago L, Toscano M, De Grandi R, Grossi E, Padovani EM, Peroni DG. Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi. *ISME J*. 2017 Apr;11(4):875-84. Disponible en: doi:10.1038/ismej.2016.183.
-

- [137] Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, Aagaard KM. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med*. 2017 Mar;23(3):314-26. Disponible en: doi:10.1038/nm.4272.
- [138] Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med*. 2016 Feb;22(3):250-3. Disponible en: doi:10.1038/NM.4039.
- [139] Wilson BC, Butler ÉM, Grigg CP, Derraik JGB, Chiavaroli V, Walker N, et al. Oral administration of maternal vaginal microbes at birth to restore gut microbiome development in infants born by caesarean section: A pilot randomised placebo-controlled trial. *EBioMedicine*. 2021 Jul;69:103443. Disponible en: doi:10.1016/J.EBIOM.2021.103443.
- [140] Murphy TV, White KE, Pastor P, Gabriel L, Medley F, Granoff DM, et al. Declining Incidence of *Haemophilus influenzae* Type b Disease Since Introduction of Vaccination. *JAMA*. 1993 Jan;269(2):246-8. Disponible en: doi:10.1001/JAMA.1993.03500020080036.
- [141] Barbour ML. Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Emerg Infect Dis*. Jul;(3):176-82. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2626802/>.
- [142] Navne JE, Koch A, Slotved HC, Andersson M, Melbye M, Ladefoged K, et al. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage by respiratory pathogens among Greenlandic children. *Int J Circumpolar Health*. 2017 Jan;76(1):1-8. Disponible en: doi:10.1080/22423982.2017.1309504.
- [143] Olwagen CP, Adrian PV, Nunes MC, Madhi SA. Evaluation of the association of pneumococcal conjugate vaccine immunization and density of nasopharyngeal bacterial colonization using a multiplex quantitative polymerase chain reaction assay. *Vaccine*. 2018 May;36(23):3278-85. Disponible en: doi:10.1016/J.VACCINE.2018.04.068.
- [144] Cerquetti M, Giufrè M. Why we need a vaccine for non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Hum Vaccin Immunother*. 2016 Sep;12(9):2357-61. Disponible en: doi:10.1080/21645515.2016.1174354.
- [145] Reiss-Mandel A, Regev-Yochay G. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* interaction and response to pneumococcal vaccination: Myth or reality? *Hum Vaccin Immunother*. 2016 Feb;12(2):351-7. Disponible en: doi:10.1080/21645515.2015.1081321.
- [146] Salgado V, Fukutani K, Fukutani E, Lima J, Rossi E, Barral A, et al. Effects of 10-valent pneumococcal conjugate (PCV10) vaccination on the nasopharyngeal microbiome. *Vaccine*. 2020 Feb;38(6):1436-43. Disponible en: doi:10.1016/J.VACCINE.2019.11.079.
- [147] Boelsen LK, Dunne EM, Mika M, Eggers S, Nguyen CD, Ratu FT, et al. The association between pneumococcal vaccination, ethnicity, and the nasopharyngeal microbiota of children in Fiji. *Microbiome*. 2019 Jul;7(1):1-16. Disponible en: doi:10.1186/S40168-019-0716-4.
- [148] Biesbroek G, Wang X, Keijser BJJ, Eijkemans RMJ, Trzciński K, Rots NY, et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerg Infect Dis*. 2014 Feb;20(2):201-10. Disponible en: doi:10.3201/eid2002.131220.
- [149] Mika M, Maurer J, Kortgen I, Allemann A, Aebi S, Brugger SD, et al. Influence of the pneumococcal conjugate vaccines on the temporal variation of pneumococcal carriage and the nasal microbiota in healthy infants: a longitudinal analysis of a case-control study. *Microbiome*. 2017 Jul;5(1):1-14. Disponible en: doi:10.1186/S40168-017-0302-6.
- [150] Tarabichi Y, Li K, Hu S, Nguyen C, Wang X, Elashoff D, et al. The administration of intranasal live attenuated influenza vaccine induces changes in the nasal microbiota and nasal epithelium gene expression profiles. *Microbiome*. 2015 Dec;3(1):1-16. Disponible en: doi:10.1186/S40168-015-0133-2.

- [151] Chen G, Xu K, Sun F, Sun Y, Kong Z, Fang B. Risk Factors of Multidrug-Resistant Bacteria in Lower Respiratory Tract Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2020 Jun;7268519. Disponible en: doi:10.1155/2020/7268519.
- [152] Cobey S, Baskerville EB, Colijn C, Hanage W, Fraser C, Lipsitch M. Host population structure and treatment frequency maintain balancing selection on drug resistance. *J R Soc Interface*. 2017 Aug;14(133):20170295. Disponible en: doi:10.1098/RSIF.2017.0295.
- [153] Sjölund M, Tano E, Blaser MJ, Andersson DI, Engstrand L. Persistence of Resistant *Staphylococcus epidermidis* after Single Course of Clarithromycin. *Emerg Infect Dis*. 2005 Sep;11(9):1389-93. Disponible en: doi:10.3201/eid1109.050124.
- [154] de Koff EM, Man WH, van Houten MA, Jansen NJG, Arp K, Hasrat R, et al. The respiratory microbiota during and following mechanical ventilation for respiratory infections in children. *Eur Respir J*. 2021 Apr;57(4):2002652. Disponible en: doi:10.1183/13993003.02652-2020.
- [155] Chonmaitree T, Jennings K, Golovko G, Khanipov K, Pimenova M, Patel JA, et al. Nasopharyngeal microbiota in infants and changes during viral upper respiratory tract infection and acute otitis media. *PLoS One*. 2017 Jul;12(7):e0180630. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0180630.
- [156] Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP, Metlay JP. Upper respiratory tract microbial communities, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Sep;78(17):6262-70. Disponible en: doi:10.1128/AEM.01051-12.
- [157] Prevaes SMPJ, De Winter-De Groot KM, Janssens HM, De Steenhuijsen Piters WAA, Tramper-Stranders GA, Wyllie AL, et al. Development of the Nasopharyngeal Microbiota in Infants with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Mar;193(5):504-15. Disponible en: doi:10.1164/RCCM.201509-1759OC.
- [158] Salter SJ, Turner C, Watthanaworawit W, de Goffau MC, Wagner J, Parkhill J, et al. A longitudinal study of the infant nasopharyngeal microbiota: The effects of age, illness and antibiotic use in a cohort of South East Asian children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Oct;11(10). Disponible en: doi:10.1371/journal.pntd.0005975.
- [159] Zhou Y, Bacharier LB, Isaacson-Schmid M, Baty J, Schechtman KB, Sajol G, et al. Azithromycin therapy during respiratory syncytial virus bronchiolitis: Upper airway microbiome alterations and subsequent recurrent wheeze. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct;138(4):1215-9.e5. Disponible en: doi:10.1016/j.jaci.2016.03.054.
- [160] Bellinghausen C, Rohde GGU, Savelkoul PHM, Wouters EFM, Stassen FRM. Viral-bacterial interactions in the respiratory tract Epidemiology and relevance of respiratory co-infections. *J Gen Virol*. 2016 Dec;97(12):3089-102. Disponible en: doi:10.1099/jgv.0.000627.
- [161] Taubenberger JK, Reid AH, Fanning TG. The 1918 Influenza Virus: A Killer Comes into View. *Virology*. 2000 Sep;274(2):241-5. Disponible en: doi:10.1006/VIRO.2000.0495.
- [162] Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. *PLoS Pathog*. 2013 Jan;9(1):e1003057. Disponible en: doi:10.1371/journal.ppat.1003057.
- [163] Kukavica-Ibrulj I, Hamelin MÈ, Prince GA, Gagnon C, Bergeron Y, Bergeron MG, et al. Infection with Human Metapneumovirus Predisposes Mice to Severe Pneumococcal Pneumonia. *J Virol*. 2009 Feb;83(3):1341-9. Disponible en: doi:10.1128/JVI.01123-08.
- [164] Verkaik N, Nguyen D, de Vogel C, Moll H, Verbrugh H, Jaddoe V, et al. *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):1840-4. Disponible en: doi:10.1111/J.1469-0691.2011.03480.X.

- [165] Nunes MC, Cutland CL, Klugman KP, Madhi SA. Pneumococcal Conjugate Vaccine Protection against Coronavirus-Associated Pneumonia Hospitalization in Children Living with and without HIV. *MBio*. 2021 Jan;12(1):e02347-20. Disponible en: doi:10.1128/mBio.02347-20.
- [166] van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JWA, Piters WAAAdS, Bosch AATM, van Gils EJM, et al. Associations between Pathogens in the Upper Respiratory Tract of Young Children: Interplay between Viruses and Bacteria. *PLoS One*. 2012 Oct;7(10):e47711. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0047711.
- [167] Chonmaitree T, Alvarez-Fernandez P, Jennings K, Trujillo R, Marom T, Loeffelholz MJ, et al. Symptomatic and Asymptomatic Respiratory Viral Infections in the First Year of Life: Association With Acute Otitis Media Development. *Clin Infect Dis*. 2015 Jan;60(1):1-9. Disponible en: doi:10.1093/CID/CIU714.
- [168] Liang G, Bushman FD. The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Mar;19(8):514-27. Disponible en: doi:10.1038/s41579-021-00536-5.
- [169] Jin X, Ren J, Li R, Gao Y, Zhang H, Li J, et al. Global burden of upper respiratory infections in 204 countries and territories, from 1990 to 2019. *EClinicalMedicine*. 2021 Jul;37:100986. Disponible en: doi:10.1016/j.eclinm.2021.100986.
- [170] Institute for Health Metrics and Evaluation. Lower respiratory infections — Level 3 cause; 2020. Disponible en: [https://www.healthdata.org/results/gbd\\_summaries/2019/lower-respiratory-infections-level-3-cause](https://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/lower-respiratory-infections-level-3-cause) [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [171] World Health Organization. The top 10 causes of death; 2020. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [172] Murphy T, Parameswaran GI. *Moraxella catarrhalis*, a Human Respiratory Tract Pathogen. *Clin Infect Dis*. 2009 Jul;49(1):124-31. Disponible en: doi:10.1086/599375.
- [173] Hilty M, Qi W, Brugger S, Frei L, Agyeman P, Frey P, et al. Nasopharyngeal microbiota in infants with acute otitis media. *J Infect Dis*. 2012 Apr;205(7):1048-55. Disponible en: doi:10.1093/INFDIS/JIS024.
- [174] Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children. *MBio*. 2011 Jan;2(1):e00245-10. Disponible en: doi:10.1128/mBio.00245-10.
- [175] Marchisio P, Claut L, Rognoni A, Esposito S, Passali D, Bellussi L, et al. Differences in nasopharyngeal bacterial flora in children with nonsevere recurrent acute otitis media and chronic otitis media with effusion: Implications for management. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 Mar;22(3):262-8. Disponible en: doi:10.1097/01.INF.0000055063.40314.DA.
- [176] Tano K, Olofsson C, Grahn-Håkansson E, Holm SE. In vitro inhibition of *S. pneumoniae*, nontypable *H. influenzae* and *M. catharralis* by alpha-hemolytic streptococci from healthy children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1999 Jan;47(1):49-56. Disponible en: doi:10.1016/S0165-5876(98)00174-8.
- [177] Teo S, Tang H, Mok D, Judd L, Watts S, Pham K, et al. Airway Microbiota Dynamics Uncover a Critical Window for Interplay of Pathogenic Bacteria and Allergy in Childhood Respiratory Disease. *Cell Host Microbe*. 2018 Sep;24(3):341-52.e5. Disponible en: doi:10.1016/J.CHOM.2018.08.005.
- [178] De Steenhuijsen Piters WAA, Heinonen S, Hasrat R, Bunsow E, Smith B, Suarez-Arrabal MC, et al. Nasopharyngeal microbiota, host transcriptome, and disease severity in children with respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Nov;194(9):1104-15. Disponible en: doi:10.1164/rccm.201602-0220OC.

- [179] Hasegawa K, Mansbach J, Ajami N, Espinola J, Henke D, Petrosino J, et al. Association of nasopharyngeal microbiota profiles with bronchiolitis severity in infants hospitalised for bronchiolitis. *Eur Respir J*. 2016 Nov;48(5):1329-39. Disponible en: doi:10.1183/13993003.00152-2016.
- [180] Kloepfer KM, Lee WM, Pappas TE, Kang TJ, Vrtis RF, Evans MD, et al. Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May;133(5):1301-7.e3. Disponible en: doi:10.1016/J.JACI.2014.02.030.
- [181] Stewart C, Mansbach J, Wong M, Ajami N, Petrosino J, Camargo C, et al. Associations of Nasopharyngeal Metabolome and Microbiome with Severity among Infants with Bronchiolitis. A Multiomic Analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Oct;196(7):882-91. Disponible en: doi:10.1164/RCCM.201701-0071OC.
- [182] Kelly MS, Surette MG, Smieja M, Pernica JM, Rossi L, Luinstra K, et al. The Nasopharyngeal Microbiota of Children with Respiratory Infections in Botswana. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Sep;36(9):e211-8. Disponible en: doi:10.1097/INF.0000000000001607.
- [183] Ho Man W, van Houten MA, Mérelle ME, Vlieger AM, Chu MLJN, Jansen NJG, et al. Bacterial and viral respiratory tract microbiota and host characteristics in children with lower respiratory tract infections: a matched case-control study. *Lancet Respir Med*. 2019 May;7(5):417-26. Disponible en: doi:10.1016/S2213-2600(18)30449-1.
- [184] Dai W, Wang H, Zhou Q, Feng X, Lu Z, Li D, et al. The concordance between upper and lower respiratory microbiota in children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Emerg Microbes Infect*. 2018 Dec;7(1):92. Disponible en: doi:10.1038/S41426-018-0097-Y.
- [185] Sakwinska O, Schmid VB, Berger B, Bruttin A, Keitel K, Lepage M, et al. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1590-4. Disponible en: doi:10.1128/JCM.03280-13.
- [186] Zhou Q, Xie G, Liu Y, Wang H, Yang Y, Shen K, et al. Different nasopharynx and oropharynx microbiota imbalance in children with *Mycoplasma pneumoniae* or influenza virus infection. *Microb Pathog*. 2020 Jul;144:104189. Disponible en: doi:10.1016/J.MICPATH.2020.104189.
- [187] Shak JR, Vidal JE, Klugman KP. Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. *Trends Microbiol*. 2013 Mar;21(3):129-35. Disponible en: doi:10.1016/J.TIM.2012.11.005.
- [188] Santagati M, Scillato M, Patanè F, Aiello C, Stefani S. Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Jun;65(1):23-31. Disponible en: doi:10.1111/J.1574-695X.2012.00928.X.
- [189] Weimer K, Armbruster C, Juneau R, Hong W, Pang B, Swords W. Coinfection with *Haemophilus influenzae* promotes pneumococcal biofilm formation during experimental otitis media and impedes the progression of pneumococcal disease. *J Infect Dis*. 2010 Oct;202(7):1068-75. Disponible en: doi:10.1086/656046.
- [190] Ndlangisa K, du Plessis M, Allam M, Wolter N, de Gouveia L, Klugman KP, et al. Invasive Disease Caused Simultaneously by Dual Serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2018 Jan;56(1):e01149-17. Disponible en: doi:10.1128/JCM.01149-17.
- [191] Marcos-Zambrano LJ, Karadzovic-Hadziabdic K, Loncar Turukalo T, Przymus P, Trajkovic V, Aasmets O, et al. Applications of Machine Learning in Human Microbiome Studies: A Review on Feature Selection, Biomarker Identification, Disease Prediction and Treatment. *Front Microbiol*. 2021 Feb;12:634511. Disponible en: doi:10.3389/FMICB.2021.634511.
- [192] Knights D, Costello EK, Knight R. Supervised classification of human microbiota. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Mar;35(2):343-59. Disponible en: doi:10.1111/J.1574-6976.2010.00251.X.

- [193] gov C. Protocol to Validate the Performance of the LifeKit® Prevent Colorectal Neoplasia Test for CRC Screening; 2021. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04693546> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [194] Amoedo J, Ramió-Pujol S, Bahí A, Puig-Amiel C, Oliver L, Torrealba L, et al. P251 RAID Dx: the first test based on faecal microbiota to differentiate irritable bowel syndrome from inflammatory bowel diseases. *J Crohn's Colitis*. 2019 Jan;13(SUPPL. 1):S222-2. Disponible en: doi:10.1093/ECCO-JCC/JJY222.375.
- [195] National Institute for Health Research. Funding and Awards. Development of RxSelex: A microbiome-based predictive diagnostic of IBD biologicals treatment outcome;. Disponible en: <https://fundingawards.nihr.ac.uk/award/NIHR200983> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [196] Konings H, Stappers S, Geens M, De Winter BY, Lamote K, van Meerbeeck JP, et al. A Literature Review of the Potential Diagnostic Biomarkers of Head and Neck Neoplasms. *Front Oncol*. 2020 Jun;10:1020. Disponible en: doi:10.3389/fonc.2020.01020.
- [197] Schlaberg R. Microbiome Diagnostics. *Clin Chem*. 2020 Jan;66(1):68-76. Disponible en: doi:10.1373/CLINCHEM.2019.303248.
- [198] Hooke R. Micrographia, or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses, with observations and inquiries thereupon. Martyn J, Allestry J, editors. Londres, Reino Unido: The Royal Society; 1665.
- [199] Lane N. The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals'. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2015 Apr;370(1666):20140344. Disponible en: doi:10.1098/RSTB.2014.0344.
- [200] Opal SM. A Brief History of Microbiology and Immunology. In: Artenstein AW, editor. *Vaccines: A Biography*. Nature Publishing Group; 2010. p. 31-56. Disponible en: doi:10.1007/978-1-4419-1108-7\_3.
- [201] Sandle T. History and development of microbiological culture media. *J Inst Sci Technol*. 2011;10-4. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/301523075\\_History\\_and\\_development\\_of\\_microbiological\\_culture\\_media](https://www.researchgate.net/publication/301523075_History_and_development_of_microbiological_culture_media).
- [202] O'Malley MA. 'Everything is everywhere: but the environment selects': ubiquitous distribution and ecological determinism in microbial biogeography. *Stud Hist Philos Sci Part C Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*. 2008 Sep;39(3):314-25. Disponible en: doi:10.1016/J.SHPSC.2008.06.005.
- [203] Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med*. 1944 Feb;79(2):137-58. Disponible en: doi:10.1084/JEM.79.2.137.
- [204] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Sci*. 1985 Dec;230(4732):1350-4. Disponible en: doi:10.1126/SCIENCE.2999980.
- [205] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7. Disponible en: doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
- [206] Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nat*. 2005 Jul;437(7057):376-80. Disponible en: doi:10.1038/nature03959.
- [207] Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016 May;17(6):333-51. Disponible en: doi:10.1038/NRG.2016.49.



- [208] Buerger L. Studies of the pneumococcus and allied organisms with reference to their occurrence in the human mouth. *J Exp Med.* 1905 Aug;7(5):497-546. Disponible en: doi:10.1084/JEM.7.5.497.
- [209] Cunliffe AC. Incidence of *Staph. Aureus* in the anterior nares of healthy children. *Lancet.* 1949 Sep;254(6575):411-4. Disponible en: doi:10.1016/S0140-6736(49)90118-X.
- [210] Turk DC. Naso-pharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type B. *Epidemiol Infect.* 1963 Jun;61(2):247-56. Disponible en: doi:10.1017/S0022172400020957.
- [211] Savolainen S, Ylikoski J, Jousimies-Somer H. The bacterial flora of the nasal cavity in healthy young men. *Rhinology.* 1986 Dec;24(4):249-55. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3547601/>.
- [212] Wade W. Detection and Culture of Novel Oral Bacteria. In: Jr NSJ, Palmer RJ, editors. *Oral Microbial Ecology: Current Research and New Perspectives.* Caister Academic Press; 2013. Disponible en: <https://www.caister.com/hsp/abstracts/oral-ecology/02.html>.
- [213] Ibrionke O, McGuinness LR, Lu SE, Wang Y, Hussain S, Weisel CP, et al. Species-level evaluation of the human respiratory microbiome. *Gigascience.* 2020 Apr;9(4):1-10. Disponible en: doi:10.1093/GIGASCIENCE/GIAA038.
- [214] Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Göker M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 Feb;64(Pt.2):352-6. Disponible en: doi:10.1099/IJS.0.056994-0.
- [215] Rayfield M, De Cock K, Heyward W, Goldstein L, Krebs J, Kwok S, et al. Mixed human immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1988 Dec;158(6):1170-6. Disponible en: doi:10.1093/INFDIS/158.6.1170.
- [216] Gama RE, Hughes PJ, Bruce CB, Stanway G. Polymerase chain reaction amplification of rhinovirus nucleic acids from clinical material. *Nucleic Acids Res.* 1988 Oct;16(19):9346. Disponible en: doi:10.1093/NAR/16.19.9346.
- [217] Zeldis Z, Lee J, Mamish D, Finegold D, Sircar R, Ling Q, et al. Direct method for detecting small quantities of hepatitis B virus DNA in serum and plasma using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest.* 1989 Nov;84(5):1503-8. Disponible en: doi:10.1172/JC1114326.
- [218] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988 Dec;16(23):11141-56. Disponible en: doi:10.1093/NAR/16.23.11141.
- [219] Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl.* 1994 Feb;3(4):S65-75. Disponible en: doi:10.1101/GR.3.4.S65.
- [220] Gilbert LL, Dakhama A, Bone BM, Thomas EE, Hegele RG. Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan;34(1):140-3. Disponible en: doi:10.1128/JCM.34.1.140-143.1996.
- [221] Bard JD, McElvania E. Panels and Syndromic Testing in Clinical Microbiology. *Clin Lab Med.* 2020 Dec;40(4):393-420. Disponible en: doi:10.1016/J.CLL.2020.08.001.
- [222] Brotons P, Villaronga M, Henares D, Armero G, Launes C, Jordan I, et al. Clinical impact of rapid viral respiratory panel testing on pediatric critical care of patients with acute lower respiratory infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020 Oct;S0213-005X(20)30285-8. Disponible en: doi:10.1016/j.eimc.2020.08.017.
- [223] Lochman J, Zapletalova M, Poskerova H, Izakovicova Holla L, Borilova Linhartova P. Rapid Multiplex Real-Time PCR Method for the Detection and Quantification of Selected Cariogenic and Periodontal Bacteria. *Diagnostics (Basel, Switzerland).* 2019 Dec;10(1):8. Disponible en: doi:10.3390/DIAGNOSTICS10010008.

- [224] Jian C, Luukkonen P, Yki-Järvinen H, Salonen A, Korpela K. Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. *PLoS One*. 2020 Jan;15(1):e0227285. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0227285.
- [225] Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009 Dec;19(12):2317-23. Disponible en: doi:10.1101/GR.096651.109.
- [226] Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH*. 2016 Sep;38(3):223-32. Disponible en: doi:10.7888/JUOEH.38.223.
- [227] Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol*. 2020 Jun;38(6):685-8. Disponible en: doi:10.1038/S41587-020-0548-6.
- [228] Zuñiga C, Zaramela L, Zengler K. Elucidation of complexity and prediction of interactions in microbial communities. *Microb Biotechnol*. 2017 Nov;10(6):1500-22. Disponible en: doi:10.1111/1751-7915.12855.
- [229] Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol*. 2017 Sep;35(9):833-44. Disponible en: doi:10.1038/NBT.3935.
- [230] Zhang Y, Thompson KN, Branck T, Yan Y, Nguyen LH, Franzosa EA, et al. Metatranscriptomics for the Human Microbiome and Microbial Community Functional Profiling. *Annu Rev Biomed Data Sci*. 2021 Jul;4:279-311. Disponible en: doi:10.1146/annurev-biodatasci-031121-103035.
- [231] Khodor SA, Reichert B, Shatat IF. The microbiome and blood pressure: can microbes regulate our blood pressure? *Front Pediatr*. 2017 Jun;5:138. Disponible en: doi:10.3389/FPED.2017.00138.
- [232] Zhang X, Li L, Butcher J, Stintzi A, Figeys D. Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches. *Microbiome*. 2019 Dec;7(1):1-12. Disponible en: doi:10.1186/S40168-019-0767-6.
- [233] Zuckerkandl E, Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol*. 1965 Mar;8(2):357-66. Disponible en: doi:10.1016/0022-5193(65)90083-4.
- [234] Fox GE, Pechman KR, Woese CR. Comparative Cataloging of 16S Ribosomal Ribonucleic Acid: Molecular Approach to Prokaryotic Systematics. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1977 Jan;27(1):44-57. Disponible en: doi:10.1099/00207713-27-1-44.
- [235] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci*. 1977 Nov;74(11):5088-90. Disponible en: doi:10.1073/PNAS.74.11.5088.
- [236] Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Nueva Jersey, EEUU: Wiley; 2015. Disponible en: doi:10.1002/9781118960608.
- [237] Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*. 2017 Nov;5(1):1-13. Disponible en: doi:10.1186/S40168-017-0373-4.
- [238] Graspentner S, Loeper N, Künzel S, Baines JF, Rupp J. Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract. *Sci Reports 2018 81*. 2018 Jun;8(1):1-7. Disponible en: doi:10.1038/s41598-018-27757-8.
- [239] Teng F, Darveekaran Nair SS, Zhu P, Li S, Huang S, Li X, et al. Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Sci Reports 2018 81*. 2018 Nov;8(1):1-12. Disponible en: doi:10.1038/s41598-018-34294-x.
- [240] Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(1):e1. Disponible en: doi:10.1093/nar/gks808.

- 
- [241] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nat*. 2006 Dec;444(7122):1022-3. Disponible en: doi:10.1038/4441022a.
- [242] Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012 Apr;2012:11. Disponible en: doi:10.1155/2012/251364.
- [243] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Aug;103(32):12115-20. Disponible en: doi:10.1073/PNAS.0605127103.
- [244] Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol* 2008 2610. 2008 Oct;26(10):1117-24. Disponible en: doi:10.1038/nbt1485.
- [245] Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol*. 2007 Jul;8(7):R143. Disponible en: doi:10.1186/GB-2007-8-7-R143.
- [246] Hollmer M. Roche to close 454 Life Sciences as it reduces gene sequencing focus; 2013. Disponible en: <https://www.fiercebiotech.com/medical-devices/roche-to-close-454-life-sciences-as-it-reduces-gene-sequencing-focus> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [247] Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nat*. 2008 Nov;456(7218):53-9. Disponible en: doi:10.1038/nature07517.
- [248] Illumina. Sequencing Platforms — Compare NGS platform applications & specifications;. Disponible en: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [249] Edgar RC. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*. 2018 Jul;34(14):2371-5. Disponible en: doi:10.1093/bioinformatics/bty113.
- [250] Santos A, van Aerle R, Barrientos L, Martinez-Urtaza J. Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Jan;18:296-305. Disponible en: doi:10.1016/J.CSBJ.2020.01.005.
- [251] Winand R, Bogaerts B, Hoffman S, Lefevre L, Delvoeye M, Braekel JV, et al. Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) Generation Sequencing Technologies. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan;21(1):298. Disponible en: doi:10.3390/IJMS21010298.
- [252] Rang FJ, Kloosterman WP, de Ridder J. From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biol*. 2018 Jul;19(1):1-11. Disponible en: doi:10.1186/S13059-018-1462-9.
- [253] Nearing JT, Douglas GM, Comeau AM, Langille MGI. Denoising the Denoisers: An independent evaluation of microbiome sequence error- correction approaches. *PeerJ*. 2018 Aug;2018(8):e5364. Disponible en: doi:10.7717/PEERJ.5364.
- [254] Prodan A, Tremaroli V, Brolin H, Zwinderman AH, Nieuwdorp M, Levin E. Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLoS One*. 2020 Jan;15(1):e0227434. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0227434.
- [255] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(5):335-6. Disponible en: doi:10.1038/nmeth.f.303.
- [256] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010 Oct;26(19):2460-1. Disponible en: doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ461.
-

- [257] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Dec;75(23):7537-41. Disponible en: doi:10.1128/AEM.01541-09.
- [258] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*. 2013 Aug;10(10):996-8. Disponible en: doi:10.1038/nmeth.2604.
- [259] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016 Jun;13(7):581-3. Disponible en: doi:10.1038/nmeth.3869.
- [260] Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Kopylova E, Morton JT, Zech Xu Z, et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *mSystems*. 2017 Apr;2(2):e00191-16. Disponible en: doi:10.1128/MSYSTEMS.00191-16.
- [261] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019 Aug;37(8):852-7. Disponible en: doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
- [262] Edgar RC. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *bioRxiv [Preprint] 2016*. Disponible en: doi:10.1101/081257.
- [263] Sarangi AN, Goel A, Aggarwal R. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. *J Clin Exp Hepatol*. 2019 Jan;9(1):62-73. Disponible en: doi:10.1016/J.JCEH.2018.04.016.
- [264] Walker SP, Barrett M, Hogan G, Flores Bueso Y, Claesson MJ, Tangney M. Non-specific amplification of human DNA is a major challenge for 16S rRNA gene sequence analysis. *Sci Rep*. 2020 Dec;10(1):16356. Disponible en: doi:10.1038/S41598-020-73403-7.
- [265] Sokal RR. The principles and practice of numerical taxonomy. *Taxon*. 1963 Jun;12(5):190-9. Disponible en: doi:10.2307/1217562.
- [266] Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2005 Oct;360(1462):1935-43. Disponible en: doi:10.1098/RSTB.2005.1725.
- [267] Stackebrandt E, Goebel BM, Wayne G, Brenner DJ, Colwell RR, D Grimont PA, et al. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*. 1994 Oct;44(4):37463-4. Disponible en: doi:10.1099/00207713-44-4-846.
- [268] Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010 Jan;60(1):249-66. Disponible en: doi:10.1099/IJS.0.016949-0.
- [269] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Feb;64(Pt 2):346-51. Disponible en: doi:10.1099/IJS.0.059774-0.
- [270] Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Nov;106(45):19126-31. Disponible en: doi:10.1073/PNAS.0906412106.
- [271] Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinforma*. 2013 Feb;14(1):1-14. Disponible en: doi:10.1186/1471-2105-14-60.
- [272] Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J*. 2017 Jul;11(12):2639-43. Disponible en: doi:10.1038/ismej.2017.119.

- 
- [273] Sun DL, Jiang X, Wu QL, Zhou NY. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Oct;79(19):5962-9. Disponible en: doi:10.1128/AEM.01282-13.
- [274] Schloss PD. Amplicon sequence variants artificially split bacterial genomes into separate clusters. *bioRxiv [Preprint] 2021.* Disponible en: doi:10.1101/2021.02.26.433139.
- [275] Caruso V, Song X, Asquith M, Karstens L. Performance of Microbiome Sequence Inference Methods in Environments with Varying Biomass. *mSystems.* 2019 Feb;4(1):e00163-18. Disponible en: doi:10.1128/MSYSTEMS.00163-18.
- [276] Claassen-Weitz S, Gardner-Lubbe S, Mwaikono KS, du Toit E, Zar HJ, Nicol MP. Optimizing 16S rRNA gene profile analysis from low biomass nasopharyngeal and induced sputum specimens. *BMC Microbiol.* 2020 May;20(1):1-26. Disponible en: doi:10.1186/S12866-020-01795-7.
- [277] Allali I, Arnold JW, Roach J, Cadenas MB, Butz N, Hassan HM, et al. A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome. *BMC Microbiol.* 2017 Sep;17(1):1-16. Disponible en: doi:10.1186/S12866-017-1101-8.
- [278] Glassman SI, Martiny JBH. Broadscale Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact Sequence Variants versus Operational Taxonomic Units. *mSphere.* 2018 Aug;3(4):e00148-18. Disponible en: doi:10.1128/MSPHERE.00148-18.
- [279] Moossavi S, Atakora F, Fehr K, Khafipour E. Biological observations in microbiota analysis are robust to the choice of 16S rRNA gene sequencing processing algorithm: case study on human milk microbiota. *BMC Microbiol.* 2020 Sep;20(1):1-9. Disponible en: doi:10.1186/S12866-020-01949-7.
- [280] 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 Aug;73(16):5261-7. Disponible en: doi:10.1128/AEM.00062-07.
- [281] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct;215(3):403-10. Disponible en: doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [282] Lu J, Salzberg SL. Ultrafast and accurate 16S rRNA microbial community analysis using Kraken 2. *Microbiome.* 2020 Aug;8(1):1-11. Disponible en: doi:10.1186/S40168-020-00900-2.
- [283] Soergel DAW, Dey N, Knight R, Brenner SE. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *ISME J.* 2012 Jul;6(7):1440-4. Disponible en: doi:10.1038/ISMEJ.2011.208.
- [284] Kopylova E, Noé L, Touzet H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics.* 2012 Dec;28(24):3211-7. Disponible en: doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTS611.
- [285] Sierra MA, Li Q, Pushalkar S, Paul B, Sandoval TA, Kamer AR, et al. The Influences of Bioinformatics Tools and Reference Databases in Analyzing the Human Oral Microbial Community. *Genes.* 2020 Aug;11(8):1-12. Disponible en: doi:10.3390/GENES11080878.
- [286] McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2011 Dec;6(3):610-8. Disponible en: doi:10.1038/ismej.2011.139.
- [287] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D590-6. Disponible en: doi:10.1093/NAR/GKS1219.
- [288] Cole J, Wang Q, Fish J, Chai B, McGarrell D, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue). Disponible en: doi:10.1093/NAR/GKT1244.
-

- [289] Eisenhofer R, Minich JJ, Marotz C, Cooper A, Knight R, Weyrich LS. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. *Trends Microbiol.* 2019 Feb;27(2):105-17. Disponible en: doi:10.1016/j.tim.2018.11.003.
- [290] Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014 Nov;12(1):87. Disponible en: doi:10.1186/s12915-014-0087-z.
- [291] Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome.* 2018 Dec;6(1):226. Disponible en: doi:10.1186/s40168-018-0605-2.
- [292] Knights D, Kuczynski J, Charlson ES, Zaneveld J, Mozer MC, Collman RG, et al. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat Methods.* 2011 Jul;8(9):761-3. Disponible en: doi:10.1038/nmeth.1650.
- [293] Whittaker RH. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon.* 1972 May;21(2-3):213-51. Disponible en: doi:10.2307/1218190.
- [294] Chao A. Nonparametric Estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat.* 1984;11(4):265-70. Disponible en: [http://dns2.asia.edu.tw/~ysho/YSH0-English/1000%20Taiwan%20\(Independent\)/PDF/Sca%20J%20Sta11,%20265.pdf](http://dns2.asia.edu.tw/~ysho/YSH0-English/1000%20Taiwan%20(Independent)/PDF/Sca%20J%20Sta11,%20265.pdf) [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [295] Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J.* 1948 Jul;27(1928):379-423. Disponible en: doi:10.1145/584091.584093.
- [296] Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nat.* 1949 Apr;163(4148):688-8. Disponible en: doi:10.1038/163688a0.
- [297] Ricotta C, Podani J, Pavoine S. A family of functional dissimilarity measures for presence and absence data. *Ecol Evol.* 2016 Aug;6(15):5383-9. Disponible en: doi:10.1002/ece3.2214.
- [298] Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr.* 1957 Feb;27(4):325-49. Disponible en: doi:10.2307/1942268.
- [299] Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Mar;73(5):1576-85. Disponible en: doi:10.1128/AEM.01996-06.
- [300] Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 2001 Feb;26(1):32-46. Disponible en: doi:10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
- [301] Clarke KR. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust J Ecol.* 1993 Mar;18(1):117-43. Disponible en: doi:10.1111/J.1442-9993.1993.TB00438.X.
- [302] Mantel N. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Res.* 1967;27(2):209-20. Disponible en: [https://cancerres.aacrjournals.org/content/27/2\\_Part\\_1/209.long](https://cancerres.aacrjournals.org/content/27/2_Part_1/209.long) [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [303] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014 Dec;15(12):1-21. Disponible en: doi:10.1186/S13059-014-0550-8.
- [304] Robinson M, McCarthy D, Smyth G. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010 Nov;26(1):139-40. Disponible en: doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTP616.
- [305] Morton JT, Marotz C, Washburne A, Silverman J, Zaramela LS, Edlund A, et al. Establishing microbial composition measurement standards with reference frames. *Nat Commun.* 2019 Jun;10(1):1-11. Disponible en: doi:10.1038/s41467-019-10656-5.

- [306] Lin H, Peddada SD. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun.* 2020 Jul;11(1):1-11. Disponible en: doi:10.1038/s41467-020-17041-7.
- [307] Fernandes AD, Macklaim JM, Linn TG, Reid G, Gloor GB. ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx) Analysis for Mixed Population RNA-Seq. *PLoS One.* 2013 Jun;8(6):e67019. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0067019.
- [308] Tsilimigras MCB, Fodor AA. Compositional data analysis of the microbiome: fundamentals, tools, and challenges. *Ann Epidemiol.* 2016 May;26(5):330-5. Disponible en: doi:10.1016/J.ANNEPIDEM.2016.03.002.
- [309] Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ. Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Front Microbiol.* 2017 Nov;8:2224. Disponible en: doi:10.3389/FMICB.2017.02224.
- [310] Weiss S, Xu ZZ, Peddada S, Amir A, Bittinger K, Gonzalez A, et al. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome.* 2017 Mar;5(1):1-18. Disponible en: doi:10.1186/s40168-017-0237-y.
- [311] Mokoena MP. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules.* 2017 Jul;22(8):1255. Disponible en: doi:10.3390/molecules22081255.
- [312] Oliveira G, González-Molero I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinol y Nutr.* 2016 Nov;63(9):482-94. Disponible en: doi:10.1016/J.ENDONU.2016.07.006.
- [313] Rondanelli M, Faliva MA, Perna S, Giacosa A, Peroni G, Castellazzi AM. Using probiotics in clinical practice: Where are we now? A review of existing meta-analyses. *Gut Microbes.* 2017 Nov;8(6):521-43. Disponible en: doi:10.1080/19490976.2017.1345414.
- [314] Coleman A, Bialasiewicz S, Marsh RL, Grahn Håkansson E, Cottrell K, Wood A, et al. Upper Respiratory Microbiota in Relation to Ear and Nose Health Among Australian Aboriginal and Torres Strait Islander Children. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2021 Apr;10(4):468-76. Disponible en: doi:10.1093/JPIDS/PIAA141.
- [315] Folino F, Fattizzo M, Ruggiero L, Oriano M, Aliberti S, Blasi F, et al. Nasopharyngeal Microbiota Analysis in Healthy and Otitis-prone Children: Focus on History of Spontaneous Tympanic Membrane Perforation. *Pediatr Infect Dis J.* 2020;40(1):16-21. Disponible en: doi:10.1097/INF.0000000000002895.
- [316] Hasegawa K, Linnemann RW, Mansbach JM, Ajami NJ, Espinola JA, Petrosino JF, et al. Nasal Airway Microbiota Profile and Severe Bronchiolitis in Infants: A Case-control Study. *Pediatr Infect Dis J.* 2017 Nov;36(11):1044-51. Disponible en: doi:10.1097/INF.0000000000001500.
- [317] Kaul D, Rathnasinghe R, Ferres M, Tan GS, Barrera A, Pickett BE, et al. Microbiome disturbance and resilience dynamics of the upper respiratory tract during influenza A virus infection. *Nat Commun.* 2020 Dec;11(1):2537. Disponible en: doi:10.1038/s41467-020-16429-9.
- [318] Toivonen L, Karppinen S, Schuez-Havupalo L, Waris M, He Q, Hoffman KL, et al. Longitudinal Changes in Early Nasal Microbiota and the Risk of Childhood Asthma. *Pediatrics.* 2020 Oct;146(4):e20200421. Disponible en: doi:10.1542/PEDS.2020-0421.
- [319] Zhou Y, Jackson D, Bacharier LB, Mauger D, Boushey H, Castro M, et al. The upper-airway microbiota and loss of asthma control among asthmatic children. *Nat Commun.* 2019 Dec;10(1):5714. Disponible en: doi:10.1038/s41467-019-13698-x.
- [320] de Steenhuijsen Pitsers WAA, Jochems SP, Mitsi E, Rylance J, Pojar S, Nikolaou E, et al. Interaction between the nasal microbiota and *S. pneumoniae* in the context of live-attenuated influenza vaccine. *Nat Commun.* 2019 Dec;10(1):2981. Disponible en: doi:10.1038/s41467-019-10814-9.

- [321] Zhang M, Wang R, Liao Y, Buijs MJ, Li J. Profiling of oral and nasal microbiome in children with cleft palate. *Cleft Palate-Craniofacial J.* 2016 May;53(3):332-8. Disponible en: doi:10.1597/14-162.
- [322] Brugger SD, Eslami SM, Pettigrew MM, Escapa IF, Henke MM, Kong Y, et al. *Dolosigranulum pigrum* cooperation and competition in human nasal microbiota. *mSphere.* 2019 Sep;5(5):e00852-20. Disponible en: doi:10.1128/mSphere.00852-20.
- [323] Moyano RO, Tonetti FR, Tomokiyo M, Kanmani P, Vizoso-Pinto MG, Kim H, et al. The Ability of Respiratory Commensal Bacteria to Beneficially Modulate the Lung Innate Immune Response Is a Strain Dependent Characteristic. *Microorganisms.* 2020 May;8(5):727. Disponible en: doi:10.3390/MICROORGANISMS8050727.
- [324] Raya Tonetti F, Tomokiyo M, Ortiz Moyano R, Quilodr n-Vega S, Yamamuro H, Kanmani P, et al. The Respiratory Commensal Bacterium *Dolosigranulum pigrum* 040417 Improves the Innate Immune Response to *Streptococcus pneumoniae*. *Microorg.* 2021 Jun;9(6):1324. Disponible en: doi:10.3390/MICROORGANISMS9061324.
- [325] Chapman TJ, Morris MC, Xu L, Pichichero ME. Nasopharyngeal colonization with pathobionts is associated with susceptibility to respiratory illnesses in young children. *PLoS One.* 2020 Dec;15(12):e0243942. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0243942.
- [326] Pillarisetti N, Broderick D, Ainsworth A, Mulholland A, MacKenzie BW, Middleton D, et al. The airway microbiota in children newly diagnosed with bronchiectasis largely retains its diversity. *Eur Respir J.* 2019 Aug;54(2):1900704. Disponible en: doi:10.1183/13993003.00704-2019.
- [327] Vissing NH, Chawes BLK, Bisgaard H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Nov;188(10):1246-52. Disponible en: doi:10.1164/rccm.201302-0215OC.
- [328] Hasegawa K, Mansbach JM, Ajami NJ, Petrosino JF, Freishtat RJ, Teach SJ, et al. The relationship between nasopharyngeal CCL5 and microbiota on disease severity among infants with bronchiolitis. *Allergy.* 2017 Nov;72(11):1796. Disponible en: doi:10.1111/ALL.13160.
- [329] Ho Man W, Clerc M, de Steenhuijsen Pijters WAA, van Houten MA, Chu MLJN, Kool J, et al. Loss of microbial topography between oral and nasopharyngeal microbiota and development of respiratory infections early in life. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019 Sep;200(6):760-70. Disponible en: doi:10.1164/rccm.201810-1993OC.
- [330] Hays JP. The Genus *Moraxella*. In: Dworkin M, Resnik Falkow S, editor. *The Prokaryotes*. New York, USA: Springer; 2006. p. 958-87. Disponible en: doi:10.1007/0-387-30746-x\_38.
- [331] List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus: *Moraxella*; 2021. Disponible en: <https://lpsn.dsmz.de/genus/moraxella> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [332] Vandamme P, Gillis M, Vancanneyt M, Hoste B, Kersters K, Falsen E. *Moraxella lincolnii* sp. nov., isolated from the human respiratory tract, and reevaluation of the taxonomic position of *Moraxella osloensis*. *Int J Syst Bacteriol.* 1993;43(3):474-81. Disponible en: doi:10.1099/00207713-43-3-474.
- [333] Lappan R, Imbrogno K, Sikazwe C, Anderson D, Mok D, Coates H, et al. A microbiome case-control study of recurrent acute otitis media identified potentially protective bacterial genera. *BMC Microbiol.* 2018 Feb;18(1). Disponible en: doi:10.1186/s12866-018-1154-3.
- [334] Cole AL, Sundar M, Lopez A, Forsman A, Yooseph S, Cole AM. Identification of Nasal Gammaproteobacteria with Potent Activity against *Staphylococcus aureus*: Novel Insights into the "Noncarrier" State. *mSphere.* 2021 Feb;6(1):e01015-20. Disponible en: doi:10.1128/MSPHERE.01015-20.
- [335] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010 Oct;192(19):5002-17. Disponible en: doi:10.1128/JB.00542-10.



- [336] Stearns JC, Davidson CJ, Mckee S, Whelan FJ, Fontes ME, Schryvers AB, et al. Culture and molecular-based profiles show shifts in bacterial communities of the upper respiratory tract that occur with age. *ISME J*. 2015 May;9(5):1246. Disponible en: doi:10.1038/ISMEJ.2014.250.
- [337] Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: Results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med*. 2014 Aug;42(8):1749-55. Disponible en: doi:10.1097/CCM.0000000000000330.
- [338] Wu S, Guo X, Xu Z, Han M, Huang L, Tao Y, et al. Early clinical predictors for the prognosis of invasive pneumococcal disease. *BMC Infect Dis*. 2020 Sep;20(1):651. Disponible en: doi:10.1186/s12879-020-05382-z.
- [339] Hernández S, Moraga-Llop F, Díaz A, de Sevilla MF, Ciruela P, Muñoz-Almagro C, et al. Failures of 13-valent conjugated pneumococcal vaccine in age-appropriately vaccinated children 2-59 months of age, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2020 Jun;26(6):1147-55. Disponible en: doi:10.3201/EID2606.190951.
- [340] Lu W, Yu J, Ai Q, Liu D, Song C, Li L. Increased constituent ratios of *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp., and *Streptococcus* sp. and a decrease in microflora diversity may be indicators of ventilator-associated pneumonia: a prospective study in the respiratory tracts of neonates. *PLoS One*. 2014 Feb;9(2):e87504. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0087504.
- [341] Gessler P, Martin F, Suter D, Berger C. Invasive pneumococcal disease in children prior to implementation of the conjugate vaccine in the Zurich region, Switzerland. *Acta Pædiatrica*. 2010 Jul;99(7):1005-10. Disponible en: doi:10.1111/J.1651-2227.2010.01748.X.
- [342] Weiss K, Low DE, Cortes L, Beaupre A, Gauthier R, Gregoire P, et al. Clinical characteristics at initial presentation and impact of dual therapy on the outcome of bacteremic *Streptococcus pneumoniae* pneumonia in adults. *Can Respir J*. 2004 Nov;11(8):589-93. Disponible en: doi:10.1155/2004/461392.
- [343] Floeystad HK, Berild JD, Brandsaeter BJ, Vestrheim DF, Berild D, Holm AM. Gastrointestinal symptoms in invasive pneumococcal disease: A cohort study. *BMC Infect Dis*. 2020 Jul;20(1):1-8. Disponible en: doi:10.1186/s12879-020-05211-3.
- [344] Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beauflis F, Wieërs G, Guery B, et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Feb;10:9. Disponible en: doi:10.3389/FCIMB.2020.00009.
- [345] Schuijt TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, De Sousa E Melo F, Roelofs JJTH, De Boer JD, et al. Original article: The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut*. 2016 Apr;65(4):575-83. Disponible en: doi:10.1136/GUTJNL-2015-309728.
- [346] Murdoch DR, Jennings LC. Association of respiratory virus activity and environmental factors with the incidence of invasive pneumococcal disease. *J Infect*. 2009 Jan;58(1):37-46. Disponible en: doi:10.1016/J.JINF.2008.10.011.
- [347] Talbot TR, Poehling KA, Hartert TV, Arbogast PG, Halasa NB, Edwards KM, et al. Seasonality of invasive pneumococcal disease: Temporal relation to documented influenza and respiratory syncytial viral circulation. *Am J Med*. 2005 Mar;118(3):285-91. Disponible en: doi:10.1016/J.AMJMED.2004.09.016.
- [348] Zhou H, Haber M, Ray S, Farley MM, Panozzo CA, Klugman KP, et al. Invasive Pneumococcal Pneumonia and Respiratory Virus Co-infections. *Emerg Infect Dis*. 2012 Feb;18(2). Disponible en: doi:10.3201/eid1802.102025.
- [349] Brealey JC, Young PR, Sloots TP, Ware RS, Lambert SB, Sly PD, et al. Bacterial colonization dynamics associated with respiratory syncytial virus during early childhood. *Pediatr Pulmonol*. 2020 May;55(5):1237-45. Disponible en: doi:10.1002/PPUL.24715.

- [350] Smith C, Sandrini S, Datta S, Freestone P, Shafeeq S, Radhakrishnan P, et al. Respiratory syncytial virus increases the virulence of *Streptococcus pneumoniae* by binding to penicillin binding protein 1a. A new paradigm in respiratory infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Jul;190(2):196-207. Disponible en: doi:10.1164/RCCM.201311-2110OC.
- [351] Lehtinen MJ, Hibberd AA, Männikkö S, Yeung N, Kauko T, Forssten S, et al. Nasal microbiota clusters associate with inflammatory response, viral load, and symptom severity in experimental rhinovirus challenge. *Sci Rep*. 2018 Dec;8(1):11411. Disponible en: doi:10.1038/S41598-018-29793-W.
- [352] Ahn DD, Huong PLT, Watanabe K, Nguyet NT, Ahn NTH, Thi NT, et al. Increased Rates of Intense Nasopharyngeal Bacterial Colonization of Vietnamese Children with Radiological Pneumonia. *Tohoku J Exp Med*. 2007 Oct;213(2):167-72. Disponible en: doi:10.1620/TJEM.213.167.
- [353] Vu HTT, Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HAT, Nguyen CDL, Nguyen ATT, et al. Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral coinfection, and radiologically confirmed pneumonia in Vietnamese children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Jan;30(1):11-8. Disponible en: doi:10.1097/INF.0B013E3181F111A2.
- [354] Wyres KL, Lambertsen LM, Croucher NJ, McGee L, Von Gottberg A, Liñares J, et al. Pneumococcal Capsular Switching: A Historical Perspective. *J Infect Dis*. 2013 Feb;207(3):439-49. Disponible en: doi:10.1093/INFDIS/JIS703.
- [355] de Steenhuijsen Piters WAA, Huijskens EGW, Wyllie AL, Biesbroek G, van den Bergh MR, Veenhoven RH, et al. Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients. *ISME J*. 2016 Jan;10(1):97-108. Disponible en: doi:10.1038/ismej.2015.99.
- [356] Haak BW, Brands X, Davids M, Peters-Sengers H, Kullberg RFJ, van Houdt R, et al. Bacterial and Viral Respiratory Tract Microbiota and Host Characteristics in Adults With Lower Respiratory Tract Infections: A Case-Control Study. *Clin Infect Dis*. 2021 Jun. Disponible en: doi:10.1093/CID/CIAB568.
- [357] Qin T, Geng T, Zhou H, Han Y, Ren H, Qiu Z, et al. Super-dominant pathobiontic bacteria in the nasopharyngeal microbiota as causative agents of secondary bacterial infection in influenza patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Jan;9(1):605-15. Disponible en: doi:10.1080/22221751.2020.1737578.
- [358] Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N Engl J Med*. 2015 Jul;373(5):415-27. Disponible en: doi:10.1056/NEJMOA1500245.
- [359] McCracken GH. Etiology and treatment of pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 Apr;19(4):373-7. Disponible en: doi:10.1097/00006454-200004000-00032.
- [360] Ederveen THA, Ferwerda G, Ahout IM, Vissers M, de Groot R, Boekhorst J, et al. *Haemophilus* is overrepresented in the nasopharynx of infants hospitalized with RSV infection and associated with increased viral load and enhanced mucosal CXCL8 responses. *Microbiome*. 2018 Jan;6(1):10. Disponible en: doi:10.1186/S40168-017-0395-Y.
- [361] Van Der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009;374(9700):1543-56. Disponible en: doi:10.1016/S0140-6736(09)61114-4.
- [362] Kai S, Matsuo Y, Nakagawa S, Kryukov K, Matsukawa S, Tanaka H, et al. Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. *FEBS Open Bio*. 2019 Mar;9(3):548-57. Disponible en: doi:10.1002/2211-5463.12590.
- [363] Pendleton KM, Erb-Downward JR, Bao Y, Branton WR, Falkowski NR, Newton DW, et al. Rapid Pathogen Identification in Bacterial Pneumonia Using Real-Time Metagenomics. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Dec;196(12):1610-2. Disponible en: doi:10.1164/RCCM.201703-0537LE.

- [364] Yang L, Haidar G, Zia H, Nettles R, Qin S, Wang X, et al. Metagenomic identification of severe pneumonia pathogens in mechanically-ventilated patients: A feasibility and clinical validity study. *Respir Res*. 2019 Nov;20(1):1-12. Disponible en: doi:10.1186/S12931-019-1218-4/TABLES/2.
- [365] Rizal NSM, Neoh HM, Ramli R, Periyasamy PRALK, Hanafiah A, Samat MNA, et al. Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics*. 2020 Oct;10(10):816. Disponible en: doi:10.3390/DIAGNOSTICS10100816.
- [366] Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan;7(1):14. Disponible en: doi:10.3390/MICROORGANISMS7010014.
- [367] Tromp I, Jong JKD, Raat H, Jaddoe V, Franco O, Hofman A, et al. Breastfeeding and the risk of respiratory tract infections after infancy: The Generation R Study. *PLoS One*. 2017 Feb;12(2):e0172763. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0172763.
- [368] de Steenhuijsen Piters WAA, Binkowska J, Bogaert D. Early Life Microbiota and Respiratory Tract Infections. *Cell Host Microbe*. 2020 Aug;28(2):223-32. Disponible en: doi:10.1016/J.CHOM.2020.07.004.
- [369] van den Elsen LWJ, Garssen J, Burcelin R, Verhasselt V. Shaping the gut microbiota by breastfeeding: The gateway to allergy prevention? *Front Pediatr*. 2019 Feb;7:47. Disponible en: doi:10.3389/FPED.2019.00047/BIBTEX.
- [370] Holgerson PL, Vestman NR, Claesson R, Öhman C, Domellöf M, Tanner ACR, et al. Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013 Feb;56(2):127-36. Disponible en: doi:10.1097/MPG.0b013e31826f2bc6.
- [371] de Sévaux JLH, Venekamp RP, Lutje V, Hak E, Schilder AGM, Sanders EAM, et al. Pneumococcal conjugate vaccines for preventing acute otitis media in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Nov;2020(11):CD001480. Disponible en: doi:10.1002/14651858.CD001480.PUB6.
- [372] Brook I, Gober AE. Bacteriology of spontaneously draining acute otitis media in children before and after the introduction of pneumococcal vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Jul;28(7):640-2. Disponible en: doi:10.1097/INF.0B013E3181975221.
- [373] Veenhoven R, Bogaert D, Uiterwaal C, Brouwer C, Kiezebrink H, Bruin J, et al. Effect of conjugate pneumococcal vaccine followed by polysaccharide pneumococcal vaccine on recurrent acute otitis media: a randomised study. *Lancet*. 2003 Jun;361(9376):2189-95. Disponible en: doi:10.1016/S0140-6736(03)13772-5.
- [374] Revai K, McCormick DP, Patel J, Grady JJ, Saeed K, Chonmaitree T. Effect of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Nasopharyngeal Bacterial Colonization During Acute Otitis Media. *Pediatrics*. 2006 May;117(5):1823-9. Disponible en: doi:10.1542/PEDS.2005-1983.
- [375] Brook I. Anaerobic infections in children. *Microbes Infect*. 2002 Oct;4(12):1271-80. Disponible en: doi:10.1016/S1286-4579(02)01656-8.
- [376] Mulhall H, Huck O, Amar S. *Porphyromonas gingivalis*, a long-range pathogen: Systemic impact and therapeutic implications. *Microorganisms*. 2020 Jun;8(6):1-15. Disponible en: doi:10.3390/microorganisms8060869.
- [377] Smith DJ, Badrick AC, Zakrzewski M, Krause L, Bell SC, Anderson GJ, et al. Pyrosequencing reveals transient cystic fibrosis lung microbiome changes with intravenous antibiotics. *Eur Respir J*. 2014 Oct;44(4):922-30. Disponible en: doi:10.1183/09031936.00203013.
- [378] Oh J, Freeman AF, NISC Comparative Sequencing Program M, Park M, Sokolic R, Candotti F, et al. The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies. *Genome Res*. 2013 Dec;23(12):2103-14. Disponible en: doi:10.1101/gr.159467.113.

- [379] Barbosa de Castro Piau C, Azevedo T, de Castro Piau A, Miranda A, Pinheiro J, Bezerra A. Oral Microbial Colonization in Pediatric Intensive Care Unit Patients. *J Dent Child (Chic)*. 2016 Jan;83(2):53-9. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/aapd/jodc/2016/00000083/00000002/art00001;jsessionid=1edqr6i1i1s0w.x-ic-live-01> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [380] Blevins JY. Status of oral health care in hospitalized children. *MCN Am J Matern Nurs*. 2013 Mar;38(2):115-9. Disponible en: doi:10.1097/NMC.0b013e318269daac.
- [381] Fourrier F, Duvivier B, Boutigny H, Roussel-Delvallez M, Chopin C. Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. *Crit Care Med*. 1998;26(2):301-8. Disponible en: doi:10.1097/00003246-199802000-00032.
- [382] Haslam DB, St Geme JW. In: Sarah S Long CGP, Fischer M, editors. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 5th ed.; Disponible en: doi:10.1016/B978-0-323-40181-4.00121-3.
- [383] Tarantino V, Savaia V, D'agostino R, Damiani V, Ciprandi G. Oral bacteriotherapy in children with recurrent respiratory infections: a real-life study. *Acta Bio Medica Atenei Parm*. 2020 Feb;91(SUPPL. 1):73-6. Disponible en: doi:10.23750/ABM.V91I1-S.9230.
- [384] Bui FQ, Almeida-da Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J*. 2019 Feb;42(1):27-35. Disponible en: doi:10.1016/j.bj.2018.12.001.
- [385] Yamasaki K, Kawanami T, Yatera K, Fukuda K, Noguchi S, Nagata S, et al. Significance of Anaerobes and Oral Bacteria in Community-Acquired Pneumonia. *PLoS One*. 2013 May;8(5):e63103. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0063103.
- [386] Suzart Gomes-Filho I, Feitosa T, De Oliveira L, Seixas Da Cruz S, De J, Passos-Soares S, et al. Influence of Periodontitis in the Development of Nosocomial Pneumonia: A Case Control Study. *J Periodontol*. 2014 May;85(5):e82-90. Disponible en: doi:10.1902/JOP.2013.130369.
- [387] Arredondo A, Blanc V, Mor C, Nart J, León R. Resistance to  $\beta$ -lactams and distribution of  $\beta$ -lactam resistance genes in subgingival microbiota from Spanish patients with periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2020 Dec;24(12):4639-48. Disponible en: doi:10.1007/s00784-020-03333-1.
- [388] Mogi A, Nishi J, Yoshinaga M, Harada H, Narahara S, Kawakami K, et al. Increased prevalence of penicillin-resistant viridans group streptococci in Japanese children with upper respiratory infection treated by beta-lactam agents and in those with oncohematologic diseases. *Pediatr Infect Dis J*. 1997 Dec;16(12):1140-4. Disponible en: doi:10.1097/00006454-199712000-00008.
- [389] Nyfors S, Könönen E, Bryk A, Syrjänen R, Jousimies-Somer H. Age-related frequency of penicillin resistance of oral *Veillonella*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Aug;46(4):279-83. Disponible en: doi:10.1016/S0732-8893(03)00082-8.
- [390] Rozkiewicz D, Daniluk T, Sciepek M, Zaremba ML, Cylwik-Rokicka D, Luczaj-Cepowicz E, et al. Prevalence rate and antibiotic susceptibility of oral viridans group streptococci (VGS) in healthy children population. *Adv Med Sci*. 2006 Jan;51(SUPPL. 1):191-5. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/6368049\\_Prevalence\\_rate\\_and\\_antibiotic\\_susceptibility\\_of\\_oral\\_viridans\\_group\\_streptococci\\_VGS\\_in\\_healthy\\_children\\_population](https://www.researchgate.net/publication/6368049_Prevalence_rate_and_antibiotic_susceptibility_of_oral_viridans_group_streptococci_VGS_in_healthy_children_population) [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [391] Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Chaieb K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microb Pathog*. 2015 Mar;80:39-49. Disponible en: doi:10.1016/j.micpath.2015.02.007.
- [392] Zingg W, Hopkins S, Gayet-Ageron A, Holmes A, Sharland M, Suetens C, et al. Health-care-associated infections in neonates, children, and adolescents: an analysis of paediatric data from the European Centre for Disease Prevention and Control point-prevalence survey. *Lancet Infect Dis*. 2017 Apr;17(4):381-9. Disponible en: doi:10.1016/S1473-3099(16)30517-5.

- [393] Haque N, Hossain MA, Bilkis L, Musa AK, Mahamud C, Bari MS, et al. Antibiotic susceptibility pattern of *Staphylococcus epidermidis*. *Mymensingh Med J*. 2009 Jul;18(2):142-7.
- [394] Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020 Aug;84(3):e00026-19. Disponible en: doi:10.1128/MMBR.00026-19.
- [395] Otto M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *Bioessays*. 2013 Jan;35(1):4-11. Disponible en: doi:10.1002/BIES.201200112.
- [396] Brook I. The role of beta-lactamase-producing-bacteria in mixed infections. *BMC Infect Dis*. 2009 Dec;9:202. Disponible en: doi:10.1186/1471-2334-9-202.
- [397] Joint FAO/WHO Expert Consultation. Probiotics in food. Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; 2006. Disponible en: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf> [Citado el 10 de febrero de 2022].
- [398] Coffey MJ, Garg M, Homaira N, Jaffe A, Ooi CY. Probiotics for people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Jan;2020(1):CD012949. Disponible en: doi:10.1002/14651858.CD012949.PUB2.
- [399] Lin J, Zhang Y, He C, Dai J. Probiotics supplementation in children with asthma: A systematic review and meta-analysis. *J Paediatr Child Health*. 2018 Sep;54(9):953-61. Disponible en: doi:10.1111/JPC.14126.
- [400] Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Feb;2015(2):CD006895. Disponible en: doi:10.1002/14651858.CD006895.PUB3.
- [401] Rashidi K, Razi B, Darand M, Dehghani A, Janmohammadi P, Alizadeh S. Effect of probiotic fermented dairy products on incidence of respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutr J*. 2021 Dec;20(1):61. Disponible en: doi:10.1186/S12937-021-00718-0.
- [402] Lee CH, Choi Y, Seo SY, Kim SH, Kim IH, Kim SW, et al. Addition of probiotics to antibiotics improves the clinical course of pneumonia in young people without comorbidities: a randomized controlled trial. *Sci Rep*. 2021 Dec;11(1):1-9. Disponible en: doi:10.1038/s41598-020-79630-2.
- [403] Najafi A, Sharif A, Sharif M, Gilassi H. The Effect of Probiotics on Bacterial Pneumonia. *Arch Clin Infect Dis*. 2020 Dec;15(6):1-6. Disponible en: doi:10.5812/ARCHCID.97851.
- [404] Bo L, Li J, Tao T, Bai Y, Ye X, Hotchkiss RS, et al. Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Oct;(10):CD009066. Disponible en: doi:10.1002/14651858.CD009066.PUB2.
- [405] Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 May;18(9):649-67. Disponible en: doi:10.1038/s41575-021-00440-6.
- [406] Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J Dent Res*. 2018 Apr;97(4):371-80. Disponible en: doi:10.1177/0022034517742139.
- [407] Lekevičius E. Vacant niches in nature, ecology, and evolutionary theory: a mini-review. *EKOLOGIJA*. 2009;55(3-4):165-74. Disponible en: doi:10.2478/v10055-009-0020-x.
- [408] Bordas A, McNab R, Staples A, Bowman J, Kanapka J, Bosma M. Impact of different tongue cleaning methods on the bacterial load of the tongue dorsum. *Arch Oral Biol*. 2008 Apr;53(SUPPL. 1):S13-8. Disponible en: doi:10.1016/S0003-9969(08)70004-9.

- [409] Carrol DH, Chassagne F, Dettweiler M, Quave CL. Antibacterial activity of plant species used for oral health against *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*. 2020 Oct;15(10):e0239316. Disponible en: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0239316.
- [410] Chhaliyil P, Fischer K, Schoel B, Chhaliyil P. Impact of Different Bedtime Oral Cleaning Methods on Dental-Damaging Microbiota Levels. *Dent Hypotheses*. 2020 Apr;11(2):40-6. Disponible en: doi:10.4103/denthyp.denthyp\_7\_20.
- [411] Manger D, Walshaw M, Fitzgerald R, Doughty J, Wanyonyi KL, White S, et al. Evidence summary: the relationship between oral health and pulmonary disease. *Br Dent J*. 2017 Apr;222(7):527-33. Disponible en: doi:10.1038/sj.bdj.2017.315.
- [412] Son M, Jo S, Lee JS, Lee DH. Association between oral health and incidence of pneumonia: a population-based cohort study from Korea. *Sci Reports*. 2020 Jun;10(1):1-9. Disponible en: doi:10.1038/s41598-020-66312-2.

## 8. Anexo





Durante el transcurso de la realización de los estudios que componen esta memoria de tesis doctoral, la doctoranda ha participado en otros proyectos vinculados con la línea de investigación en Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma.

A continuación se explican y añaden las referencias a los trabajos directamente relacionados con la implicación de la microbiota humana en diferentes enfermedades.

El primer trabajo de este anexo pretendía investigar la relación de la microbiota nasofaríngea con la tos ferina. La tos ferina es otra infección respiratoria potencialmente prevenible por vacunación causada por *Bordetella pertussis*, una bacteria patógena primaria cuya puerta de entrada es la nasofaringe. Este trabajo pretendía, además, investigar las posibles diferencias con la microbiota nasofaríngea de niños con sospecha clínica de la enfermedad, pero sin confirmación microbiológica. Se trata de un estudio prospectivo con diseño de test-negativo caso-control realizado en HSJD durante el año 2016.

1. Rocafort M, **Henares D**, Brotons P, Barrabeig I, Launes C, Merdrignac L, Valenciano M, Dominguez A, Godoy P, Muñoz-Almagro C. Exploring the nasopharyngeal microbiota composition in infants with whooping cough: A test-negative case-control study. *PLoS One*. 2021 Oct;16(10):e0259318. doi: 10.1371/journal.pone.0259318

*ISI Journal Citation Reports ® 2020. Área de conocimiento; Ciencia Multidisciplinar. Clasificación; 26/72. Cuartil: Q2. Factor de impacto: 3.240*

El segundo estudio de este anexo pretendía evaluar la composición de microbiota intestinal en adolescentes con síndrome del ovario poliquístico, ya que se ha sugerido que la microbiota intestinal podría estar relacionada con la patogénesis de la enfermedad. Además, este trabajo pretendía evaluar los cambios en la composición de la microbiota intestinal asociados a dos tratamientos utilizados para esta patología; el SPIOMET y anticonceptivos orales. Se trata de un estudio clínico aleatorizado realizado en HSJD entre diciembre de 2015 y octubre de 2019.

2. Garcia-Beltran C, Malpique R, Carbonetto B, Gonzalez-Torres P, **Henares D**, Brotons P, Muñoz-Almagro C, Lopez-Bermejo A, de Zegher F, Ibañez L. Gut microbiota in adolescent girls with polycystic ovary syndrome: Effects of randomized treatments. *Pediatr Obes*. 2021 Apr;16(4):e12734. doi: 10.1111/ijpo.12734

*ISI Journal Citation Reports ® 2020. Área de conocimiento; Pediatría. Clasificación; 13/129. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 4.000*

Finalmente, la doctoranda también ha participado en otros proyectos relacionados con la clínica, la epidemiología molecular y la mejora de las herramientas de vigilancia y de diagnóstico de las principales enfermedades infecciosas pediátricas.

3. Brotons P, Bassat Q, Lanaspá M, **Henares D**, Perez-Arguello A, Madrid L, Balcells R, Acacio S, Andres-Franch M, Marcos MA, Valero-Rello A, Muñoz-Almagro C. Nasopharyngeal bacterial load as a marker for rapid and easy diagnosis of invasive pneumococcal disease in children from Mozambique. *PLoS One*. 2017 Sep 14;12(9):e0184762. doi: 10.1371/journal.pone.0184762

*ISI Journal Citation Reports ® 2020. Área de conocimiento; Ciencia Multidisciplinar. Clasificación; 26/72. Cuartil: Q2. Factor de impacto: 3.240*

4. Velasco-Arnaiz E, Perez E, **Henares D**, Fernandez-Lopez A, Valls A, Brotons P, Fortuny C, Noguera-Julian A. Use of procalcitonin in the diagnosis of tuberculosis in infants and preschool children. *Eur J Pediatr*. 2018 Sep;177(9):1377-1381. doi: 10.1007/s00431-018-3099-9

*ISI Journal Citation Reports ® 2020. Área de conocimiento; Pediatría. Clasificación; 28/129. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 3.183*

5. Ciruela P, Izquierdo C, Broner S, Muñoz-Almagro C, Hernandez S, Ardanuy C, Pallares R, Dominguez A, Jane M; Catalan Working Group on Invasive Pneumococcal Disease. The changing epidemiology of invasive pneumococcal disease after PCV13 vaccination in a country with intermediate vaccination coverage. *Vaccine*. 2018 Nov;36(50):7744-7752. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.026

*ISI Journal Citation Reports ® 2020. Área de conocimiento; Medicina, Investigación y Experimentación. Clasificación; 76/140. Cuartil: Q3. Factor de impacto: 3.641*

6. Valero-Rello A, **Henares D**, Acosta L, Jane M, Jordan I, Godoy P, Muñoz-Almagro C. Validation and Implementation of a Diagnostic Algorithm for DNA Detection of *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii* in a Pediatric Referral Hospital in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol*. 2019 Jan;57(1):e01231-18. doi: 10.1128/JCM.01231-18

*ISI Journal Citation Reports ® 2020. Área de conocimiento; Microbiología. Clasificación; 22/136. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 5.948*

- 
7. Ciruela P, Broner S, Izquierdo C, Pallares R, Muñoz-Almagro C, Hernandez S, Grau I, Dominguez A, Jane M; Catalan Working Group on Invasive Pneumococcal Disease. Indirect effects of paediatric conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in older adults. *Int J Infect Dis.* 2019 Sep;86:122-130. doi: 10.1016/j.ijid.2019.06.030

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Enfermedades Infecciosas. Clasificación; 45/93. Cuartil: Q2. Factor de impacto: 3.623*

8. Brotons P, Villaronga M, **Henares D**, Armero G, Launes C, Jordan I, Muñoz-Almagro C. Clinical impact of rapid viral respiratory panel testing on pediatric critical care of patients with acute lower respiratory infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020 Oct;8:S0213-005X(20)30285-8. doi: 10.1016/j.eimc.2020.08.017

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Microbiología. Clasificación; 124/136. Cuartil: Q4. Factor de impacto: 1.731*

9. Garcia-Garcia S, Perez-Arguello A, **Henares D**, Timoneda N, Muñoz-Almagro C. Rapid identification, capsular typing and molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* by using whole genome nanopore sequencing. *BMC Microbiol.* 2020 Nov;20(1):347. doi: 10.1186/s12866-020-02032-x

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Microbiología. Clasificación; 62/136. Cuartil: Q2. Factor de impacto: 3.605*

10. Jullien S, Sharma R, Lhamu Mynak M, **Henares D**, Muñoz-Almagro C, Bassat Q. Pneumococcal nasopharyngeal carriage among Bhutanese children hospitalized with clinical pneumonia: serotypes and viral co-infection. *BMC Infect Dis.* 2020 Dec;20(1):940. doi: 10.1186/s12879-020-05674-4

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Enfermedades Infecciosas. Clasificación; 57/93. Cuartil: Q3. Factor de impacto: 3.090*

11. Mele M, **Henares D**, Pino R, Asenjo S, Matamoros R, Fumado V, Fortuny C, Garcia-Garcia JJ, Jordan I, Brotons P, Muñoz-Almagro C, de-Sevilla MF, Launes C; Kids-Corona Paediatric Hospitalist group. Low impact of SARS-CoV-2 infection among paediatric acute respiratory disease hospitalizations. *J Infect.* 2021 Mar;82(3):414-451. doi: 10.1016/j.jinf.2020.10.013

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Enfermedades Infecciosas. Clasificación; 10/93. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 6.072*

12. Brotons P, Launes C, Buetas E, Fumado V, **Henares D**, de Sevilla MF, Redin A, Fuente-Soro L, Cuadras D, Mele M, Jou C, Millat P, Jordan I, Garcia-Garcia JJ, Bassat Q, Muñoz-Almagro C; Kids Corona Study Group. Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection Among Children and Adults: A Seroprevalence Study of Family Households in the Barcelona Metropolitan Region, Spain. *Clin Infect Dis*. 2021 Jun;72(12):e970-e977. doi: 10.1093/cid/ciaa1721

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Enfermedades Infecciosas. Clasificación; 3/93. Cuartil: Q1. Factor de impacto: 9.079*

13. Brotons P, Jordan I, Bassat Q, **Henares D**, Fernandez de Sevilla M, Ajanovic S, Redin A, Fumado V, Baro B, Claverol J, Varo R, Cuadras D, Hecht J, Barrabeig I, Garcia-Garcia JJ, Launes C, Muñoz-Almagro C. The Positive Rhinovirus/Enterovirus Detection and SARS-CoV-2 Persistence beyond the Acute Infection Phase: An Intra-Household Surveillance Study. *Viruses*. 2021 Aug;13(8):1598. doi: 10.3390/v13081598

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Virología. Clasificación; 10/37. Cuartil: Q2. Factor de impacto: 5.048*

14. Penela-Sanchez D, Gonzalez-de-Audicana J, Armero G, **Henares D**, Esteva C, de-Sevilla MF, Ricart S, Jordan I, Brotons P, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C, Launes C. Lower Respiratory Tract Infection and Genus Enterovirus in Children Requiring Intensive Care: Clinical Manifestations and Impact of Viral Co-Infections. *Viruses*. 2021 Oct 14;13(10):2059. doi: 10.3390/v13102059

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Virología. Clasificación; 10/37. Cuartil: Q2. Factor de impacto: 5.048*

15. Felix S, **Henares D**, Muñoz-Almagro C, Sa-Leão R. Carriage of multiple *Streptococcus pneumoniae* capsular types is frequent among children with invasive pneumococcal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021 Nov;40(11):2397-2401. doi: 10.1007/s10096-021-04231-4

*ISI Journal Citation Reports @ 2020. Área de conocimiento; Microbiología. Clasificación; 78/136. Cuartil: Q3. Factor de impacto: 3.267*