



ESTUDIO DEL MICROBIOMA: ESTANDARIZACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Laura López Pérez



VILLAVICIOSA DE ODÓN, OCTUBRE DE 2020
MÁSTER EN MICROBIOTA, PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS



**Universidad
Europea**

LAUREATE INTERNATIONAL UNIVERSITIES

Título del Trabajo: Estudio del microbioma: Estandarización y análisis de datos.

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología perteneciente al Centro Nacional de Microbiología (CNM), en el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).



Tutor interno: Abelardo Margolles Barros.

Tutoras externas: Ana Alastruey Izquierdo y Laura Alcázar Fuoli.

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	3
ESTUDIO DEL MICROBIOMA: ESTANDARIZACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	4
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Microbiota, microbioma y micobioma	5
Micobioma ambiental.....	5
Micobioma pulmonar	6
Estudio del micobioma y los problemas que presenta	6
OBJETIVO.....	7
METODOLOGÍA DEL TRABAJO.....	8
Obtención y tratamiento de las muestras	8
Técnicas basadas en cultivo.....	9
Identificación por espectrometría de masas	9
Identificación por biología molecular	10
Técnicas no basadas en cultivo: NGS.....	10
Extracción de ADN.....	10
Muestras y controles estudiados por NGS	12
Análisis de secuencias obtenidas por NGS.....	13
RESULTADOS.....	14
Análisis de muestras ambientales	14
Técnicas dependientes de cultivo	14
Técnicas independientes de cultivo	16
Análisis de secuencias obtenidas por NGS	16
Análisis del micobioma ambiental y pulmonar.....	20
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	29
ANEXOS.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	38

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APD – Agar Patata Dextrosa

ATCC – Colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*)

CNM – Centro Nacional de Microbiología

DMSO – Dimetilsulfóxido

EUCAST – Comité Europeo de ensayos de sensibilidad a antimicrobianos (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

GYEP – Medio de cultivo, siglas de *Glucose, Yeast Extract, Peptone*

ITS – Espaciador transcrito interno (*Internal Transcribed spacer*)

IVD – *In vitro* Diagnostic

MALDI-TOF – Acrónimo de “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization” y “Time of flight”

NGS – *Next Generation Sequencing*

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)

RUO – *Research Use Only*

UFC – Unidades Formadoras de Colonias

ESTUDIO DEL MICROBIOMA: ESTANDARIZACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

RESUMEN

El microbioma engloba a los microorganismos y las condiciones ambientales en las que se encuentran. El micobioma es la comunidad fúngica perteneciente al microbioma y, aunque se encuentra de manera natural en el cuerpo humano, es de naturaleza oportunista. El estudio del micobioma ambiental es importante para comprender mejor el desarrollo del micobioma pulmonar, sin embargo, presenta una serie de retos desde la obtención de muestras hasta el análisis de las secuencias de ADN. En este trabajo se pretende estandarizar metodologías para la caracterización del micobioma, para lo cual se estudiaron muestras ambientales mediante métodos dependientes de cultivo y muestras tanto ambientales como pulmonares mediante técnicas NGS (*Next Generation Sequencing*). Las muestras ambientales fueron tomadas por un equipo de muestreo en una zona urbana (Villaverde) y en una zona semiurbana (Majadahonda) con los mismos parámetros de tiempo y volumen de aire recogido establecidos, y las muestras clínicas consistieron en esputos obtenidos de diversos hospitales de la Comunidad de Madrid. El hongo más comúnmente encontrado en las muestras ambientales fue *Aspergillus fumigatus*. Los resultados obtenidos por NGS mostraron más variedad de géneros frente a las técnicas dependientes de cultivo, pues son más precisas y pueden aportar más información acerca de las poblaciones fúngicas de una muestra. No obstante, los resultados dependen de las bases de datos de comparación.

Palabras clave: Micobioma, *Aspergillus*, extracción, NGS.

INTRODUCCIÓN

Microbiota, microbioma y micobioma

La microbiota es el conjunto de microorganismos que colonizan el cuerpo de animales y humanos. Dichos microorganismos realizan funciones que ayudan al correcto funcionamiento del sistema inmunitario y son de vital importancia para el mantenimiento de la homeostasis. La diversidad y la composición de la microbiota están determinadas por muchos factores como los factores ambientales, la genética del huésped o su inmunidad (Jian Wang et al., 2017; (Michelle G. Rooks et al., 2016).

El término microbioma engloba a los microorganismos, entre los que se cuentan bacterias, arqueas, eucariontes y virus, sus genomas, y las condiciones ambientales en las que se encuentran (Julian R. Marchesi and Jacques Ravel, 2015).

En las últimas décadas se ha demostrado que el microbioma influye enormemente en la fisiología del hospedador, en su metabolismo, en su sistema inmune y nervioso. Por este motivo, es importante entender cómo se adquiere el microbioma y qué funciones realiza en la salud y en la enfermedad (Patrick C. Seed, 2015).

El micobioma es el colectivo de hongos dentro del microbioma. Dichos hongos se encuentran naturalmente en el cuerpo humano en órganos como como la piel, el intestino, los pulmones o la vagina (Patrick C. Seed, 2015).

Los hongos son microorganismos oportunistas, causan enfermedades graves en personas con factores de riesgo. *Aspergillus* se aísla frecuentemente en el ambiente y es también uno de los principales patógenos fúngicos humanos siendo agente causal de un amplio rango de infecciones que van desde la enfermedad invasiva aguda hasta las infecciones crónicas como el asma (Aidan K. Curran and David L. Hava, 2021).

Micobioma ambiental

La composición de hongos en el ambiente constituye el micobioma ambiental. La temperatura y la humedad relativa son factores importantes que determinan la composición de la comunidad de hongos en el aire (Malcolm Richardson et al., 2018). Un estudio realizado en China reveló que los géneros dominantes en exteriores son *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Dong Yan et al., 2016) todos ellos capaces de causar infecciones en humanos.

Microbioma pulmonar

El estudio del microbioma pulmonar es reciente, pues hasta hace relativamente poco se pensaba que los pulmones sanos eran órganos estériles y no se concebía la posibilidad de que tuvieran su propia microbiota (David A. Relman, 2015; Laura Tipton et al., 2017; Lijia Cui et al., 2013; Markus Hilty et al., 2009).

Aunque los primeros estudios del microbioma pulmonar se centraron exclusivamente en las poblaciones bacterianas (Laura Tipton et al., 2017), la llamada “secuenciación de próxima generación” o “NGS” (*Next Generation Sequencing*) ha permitido confirmar la presencia de hongos y virus (Danielle Weaver et al., 2019; Laura Tipton et al., 2017).

Los taxones fúngicos más comúnmente identificados en muestras pulmonares de individuos sanos pertenecen a la familia *Davidiellaceae* y los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Eurotium*. Otros géneros encontrados también en pulmones sanos son *Candida*, *Malassezia*, *Neosartorya*, *Kluyveromyces*, *Hyphodontia* y *Pneumocystis* (Emily S. Charlson et al., 2012; Laura Tipton et al., 2017).

Estudio del microbioma y los problemas que presenta

El estudio del microbioma se basó durante años en técnicas de cultivo, pero estas técnicas tienen baja sensibilidad y son fácilmente contaminables, además, por lo general son lentas y una vez ha crecido el hongo se requiere un paso más para la identificación de las especies fúngicas (Danielle Weaver et al., 2019; Poornima Ramanan et al., 2017). El desarrollo de nuevas técnicas y métodos independientes de cultivo ha aumentado nuestra capacidad para identificar el microbioma y estudiar su relación con el desarrollo de ciertas enfermedades (Brett J. Green, 2019; Laurence Delhaes et al., 2012; Lijia Cui et al., 2013) pero la complejidad de los métodos utilizados y sus múltiples etapas con cierta propensión a los sesgos y a la introducción de errores (Danielle Weaver et al., 2019; Laura Tipton et al., 2017) pone de manifiesto la necesidad de optimizar los métodos existentes.

El primer reto se presenta en el paso de muestreo, por ejemplo la obtención de muestras puras derivadas de pulmón es complicada, dado que las muestras del tracto respiratorio inferior se pueden ver contaminadas por las del tracto superior en el proceso (Danielle Weaver et al., 2019; Laura Tipton et al., 2017). En cuanto a los procedimientos para la obtención de muestras, la broncoscopia es invasiva y se realiza con poca frecuencia, de manera que la mayoría de los estudios del microbioma utilizan muestras de esputo, que representa una estrategia fácil y no invasiva (Danielle Weaver et al., 2019; Martina Oriano

et al., 2019). El tratamiento de muestras obtenidas de esputos presenta un reto extra, y es que el esputo es un sustrato con una matriz compleja y complicada de manejar, por lo que el uso de diferentes técnicas para la extracción de ADN del esputo puede estar limitado por su naturaleza (Martina Oriano et al., 2019).

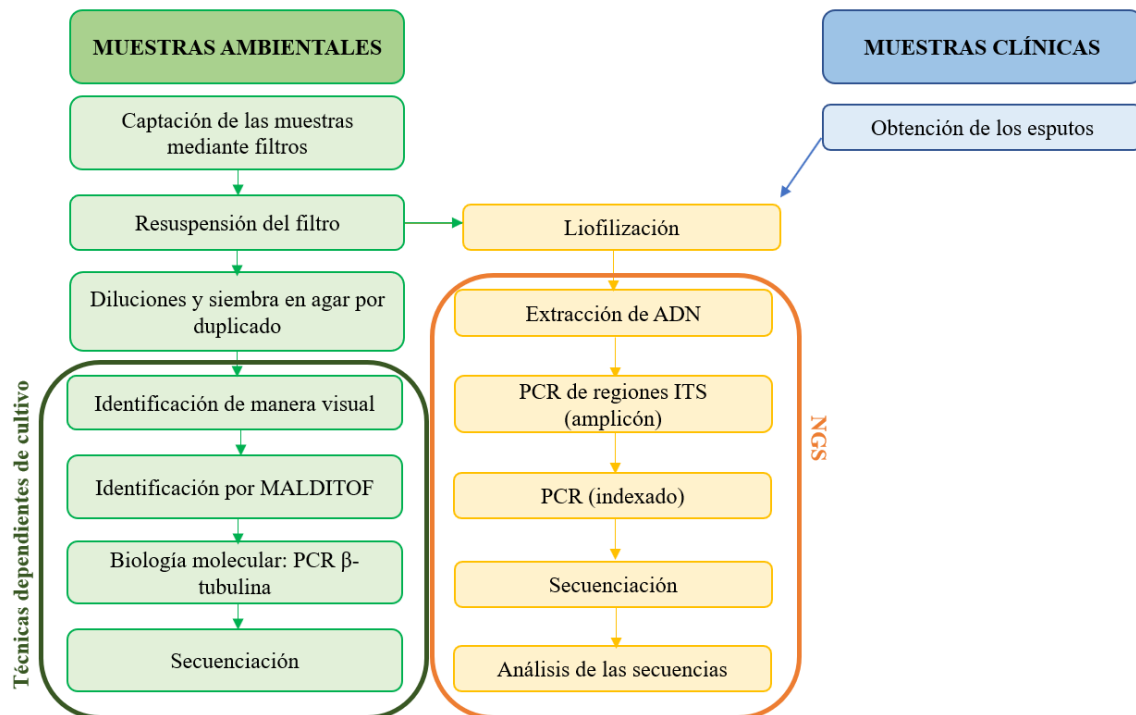
El siguiente reto es la extracción del ADN. Es difícil generar un extracto de ADN que represente con exactitud la comunidad fúngica y es importante encontrar el método de extracción apropiado (Danielle Weaver et al., 2019). En el caso de los hongos hay que romper la pared celular, compuesta por una combinación de glucanos y quitina de manera variable dependiendo del hongo y sus patrones de crecimiento, esto hace que haya una gama de diferentes resistencias y, por lo tanto, se requiere de diferentes durezas en los métodos de ruptura de la pared celular. El método que ha resultado ser más eficaz es la desintegración mecánica, pero se corre el riesgo de cizallar el ADN, sin embargo, el protocolo de extracción basado en enzimas favorece la extracción de levaduras frente a hongos filamentosos (Danielle Weaver et al., 2017).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es la estandarización de metodologías para la caracterización del microbioma a partir de muestras ambientales y pulmonares. Para ello, se recolectaron muestras de origen ambiental mediante filtrado de aire y esputos con los que se probaron diferentes técnicas de extracción e identificación para conseguir una correcta caracterización de las especies fúngicas pertenecientes al microbioma.

METODOLOGÍA DEL TRABAJO

En este trabajo se utilizaron metodologías dependientes de cultivo y de NGS para el estudio de las muestras ambientales y clínicas.



Obtención y tratamiento de las muestras

Para las muestras ambientales se realizaron dos campañas de muestreo en colaboración con el Centro Nacional de Sanidad Ambiental en dos estaciones: en la sede del ISCIII en Majadahonda (zona semiurbana) y en una estación en el Centro de Salud San Andrés de Villaverde (Madrid, zona urbana). Para realizar estas captaciones se hizo pasar el aire a través de unos filtros de gelatina (Sartorius) siguiendo las Especificación Técnica CEN/TS 16115-1:2011 de AENOR (AENOR, 2013). Fueron catalogadas las captaciones numéricamente según el lugar, el día, las horas de captación y la hora a la que se tomaron, habiéndose fijado previamente el volumen de aire que pasa por cada filtro (12m^3) y el tiempo de captación (4 horas), además se tomaron datos adicionales como la climatología, temperatura y la humedad relativa. El equipo de muestreo está recogido en el anexo I.

Para la estandarización de la metodología a partir de muestras clínicas se recogieron esputos de pacientes con diversas patologías (desconocidas) procedentes de varios hospitales de la comunidad de Madrid.

Técnicas basadas en cultivo

Las muestras ambientales se procesaron mediante técnicas clásicas para conocer la composición de hongos en las mismas. Debido a la escasez y dificultad de obtención de las muestras clínicas este procedimiento no se llevó a cabo con los esputos analizados. El filtro recogido de la captación ambiental se resuspendió en 10ml de solución salina (0,85% NaCl) con 0,01% polisorbato 80 (AENOR, 2013) y se hicieron 2 diluciones (1:10 y 1:100), después se sembraron en placas de agar Sabouraud (Oxoid, Reino Unido)) y se incubaron a 30°C durante 2 días o hasta ver crecimiento de colonias.

Diariamente se revisó el crecimiento de colonias que fueron aisladas en tubos de Agar patata-dextrosa (APD) para hongos filamentosos (Oxoid, Reino Unido) o en placas SAB para levaduras. Se realizó un recuento total de unidades formadoras de colonias (UFC) para cada dilución tras 24-48 horas de incubación.

Se identificaron los aislados de manera visual a nivel de género y se confirmó la identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF y/o por biología molecular para el género *Aspergillus* mediante la amplificación y secuenciación de β -tubulina.

Identificación por espectrometría de masas

La extracción se realizó con el kit Vitek® MS mould siguiendo las especificaciones del fabricante a partir de cultivos puros, para ello, se recogió un círculo de 1 a 2 cm de diámetro usando un hisopo húmedo de etanol al 70%, que fue suspendido en 900 μ l de etanol al 70% en un tubo de 2ml, se mezcló bien con el vortex y fue centrifugado durante 2min a 10000-14000rpm. El sobrenadante fue descartado y se añadieron 40 μ l de ácido fórmico al 70%, tras mezclarlo en vortex se añadieron 40 μ l de acetonitrilo y se volvió a mezclar en vortex antes de centrifugar 2min a 10000-14000rpm.

Tras la extracción, se depositó 1 μ l de sobrenadante en la placa y se dejó secar antes de añadir 1 μ l de matriz CHCA (bioMérieux España S.A., s. f.). Se utilizó la cepa 8739 de *E. coli* de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) como referencia.

Se analizaron los perfiles obtenidos por espectrometría de masas y se contrastaron con las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos de IVD (*In vitro Diagnostic*) y RUO (Research Use Only) de bioMérieux.

Identificación por biología molecular

Aquellas cepas que no pudieron identificarse por MALDI-TOF o que no correspondían con la identificación presuntiva que se había realizado visualmente, se identificaron por biología molecular.

Para ello se extrajo el ADN empleando el método del fenol-cloroformo (C. M. Tang et al., 1992), detallado en el anexo II.

Se amplificó una región del gen que codifica para la β -tubulina (S. Arunmozhi Balajee et al., 2005) de las muestras identificadas como *Aspergillus* siguiendo un protocolo previamente descrito (condiciones de PCR en el anexo III) (A. Alastruey-Izquierdo et al., 2013).

Técnicas no basadas en cultivo: NGS

Tanto las muestras ambientales como las clínicas se sometieron a un proceso de extracción para poder realizar el estudio mediante secuenciación masiva siguiendo los siguientes pasos:

Extracción de ADN

Las muestras se transfirieron a tubos Falcon 50ml, se taparon con Parafilm, se hicieron unos pequeños agujeros y se liofilizaron durante 16 horas.

Al día siguiente se añadió 1ml de DTT 0,1%, se incubaron 1h a 37°C y se mezclaron en vortex cada 10 minutos. Se añadieron las muestras a tubos con tapa de rosca con 300 μ l de *beads* y se usó el Fastprep a 6000rpm durante 10 segundos 2 veces. Se añadieron 750 μ l de tampón bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), se incubaron durante 3 ciclos de 10min a 60-65°C y mezclaron con vortex 10min. Se centrifugaron 5min a 13400rpm. Se recogieron 800 μ l del sobrenadante en un eppendorf *safe lock* estéril y se añadieron 4 μ l de RNAsa A (100mg/ml). Se incubaron durante 30min a 37°C. Se añadieron 800 μ l de fenol cloroformo y se mezcló en vortex 10s. Se centrifugaron durante 2min a 13400rpm y se recogieron 700 μ l de la fase acuosa (superior) y se pasaron a un *safe lock* nuevo. Se centrifugaron durante 2min a 13400rpm, se recogieron 600 μ l de la fase acuosa (superior) y se pasaron a un *safe lock* nuevo. Se añadieron 800 μ l de fenol cloroformo y se mezclaron en vortex 10s. Se centrifugaron durante 2min a 13400rpm. Se recogieron 700 μ l de la fase acuosa (superior) y se pasaron a un *safe lock* nuevo. Se centrifugaron durante 2min a 13400rpm. Se recogieron 600 μ l de la fase acuosa y se pasaron a un *safe lock* nuevo. Se añadieron 600 μ l de cloroformo-isoamílico (25:1) y se mezclaron en vortex durante 10s.

Se centrifugaron durante 2min a 13400rpm, se recogieron 450µl de la fase acuosa (superior) y se pasaron a un *safe lock* nuevo. Se añadieron 0,1 volúmenes/ml de NaAc (pH 5,2) y 2 volúmenes etanol (EtOH)/ml al 100% frío. Se mezclaron por inversión. Se incubaron a -20°C durante la noche.

Al día siguiente se centrifugaron durante 8min a 13400rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 800µl de EtOH 100% y se mezclaron por inversión. Se centrifugaron durante 2min a 9000rpm. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 800µl de EtOH 70% y se mezclaron nuevamente por inversión. Se centrifugaron durante 2min a 9000rpm y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 800µl de EtOH 70% y se mezclaron por inversión. Se centrifugaron durante 2min a 9000rpm. Se descartó el sobrenadante. Se dejó secar las muestras a temperatura ambiente. Finalmente se comprobó en gel 1,2% de agarosa.

Se incluyó un control negativo de extracción consistente en DTT 0,1% y un control positivo que consistió en una cepa de *Aspergillus fumigatus* (100 esporas/µl).

PCR de las regiones ITS

El protocolo de PCR de las regiones ITS se realizó basado en el protocolo de Illumina (Illumina, 2019).

La mezcla de reacción de la PCR estuvo constituida por 12,5µl de 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix, 5µl de cebadores forward 1µM (Tabla 1 del Anexo IV), 5µl de cebadores reverse 1µM (detallados en la tabla 2 del Anexo IV), 5,5µl de agua y 2µl de muestra.

Se incluyó una cepa de *Aspergillus niger* como control positivo (5ng/µl).

Las condiciones de PCR fueron un primer ciclo de 30 segundos a 98°C, 50 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C y un ciclo final de 10 minutos a 72°C.

Purificación

Se realizó una purificación de los productos de PCR previo al PCR de indexado siguiendo el protocolo de Illumina (Illumina, 2019).

Index PCR

Se preparó mastermix y se distribuyeron los *Nextera Index Primer* para que cada muestra tuviera una combinación única siguiendo una variación de las instrucciones de Illumina.

La mezcla de reacción de la PCR estuvo constituida por 25µl de 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix, 5µl de Nextera XT index Primer 1 (N7XX) (Tabla 3 del Anexo IV), 5µl de Nextera XT index Primer 2 (S5XX) (Tabla 3), 10µl de agua y 5µl de muestra (Illumina, 2019).

Las condiciones de PCR fueron un primer ciclo de 3 minutos a 95°C, 8 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C y un ciclo de 5 minutos a 72°C y 5 minutos a 4°C.

Se realizó la purificación del indexado siguiendo las instrucciones de Illumina (Illumina, 2019) y posteriormente se realizó un pool de las muestras isovolumétrico que se cuantificó con Quantifluor. La secuenciación se hizo también siguiendo el protocolo de Illumina (Illumina, 2019) utilizando un secuenciador Miseq (Illumina, 2017).

Muestras y controles estudiados por NGS

Se utilizaron como controles positivos de las muestras ambientales dos filtros disueltos mezclados con esporas de ATCC2579 (*Aspergillus flavus*) y ATCC2580 (*Aspergillus fumigatus*), se utilizó como control negativo en los procesos de extracción de ADN el DTT 0,1%, como control positivo de extracción una cepa de *A. fumigatus* (CAAI-364) a una concentración de 100 esporas/µl y como control positivo de PCR 5ng/µl de ADN de *Aspergillus niger* (CAAI-331) (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras y controles estudiados por NGS. ID: Identificador; CAAI: Colección de Ana Alastruey Izquierdo.

Tipo de muestra	ID	Descripción
Clínicas	Esputo 1	Esputo
	Esputo 2	Esputo
	Esputo 3	Esputo
	Esputo 4	Esputo
	Esputo 5	Esputo
	Esputo 6	Esputo
	Esputo 7	Esputo
	Esputo 8	Esputo
	Esputo 9	Esputo
	Esputo 10	Esputo
Captaciones ambientales	MAJA 1503-1	Filtro disuelto
	MAJA 1503-2	Filtro disuelto
	MAJA 1503-3	Filtro disuelto
	MAJA 1503-4	Filtro disuelto
	MAJA 1907	Filtro disuelto
	VILL 1907	Filtro disuelto
Control positivo de extracción	CAAI-364	Esporas de <i>A. fumigatus</i> (100 esporas/ μ l)
Control negativo de extracción	DTT 0,1%	-
Control positivo de PCR	CAAI-331	ADN de <i>A. niger</i> (5ng/ μ l)
Filtro con esporas 1	ATCC2579	Esporas de <i>A. flavus</i> (100 esporas/ μ l)
Filtro con esporas 2	ATCC2580	Esporas de <i>A. fumigatus</i> (100 esporas/ μ l)

Se hicieron dos extracciones, de manera que se dividieron las muestras en dos tandas.

Análisis de secuencias obtenidas por NGS

La calidad de las secuencias se estudió mediante parámetros bioinformáticos como el número de secuencias de cada muestra o la longitud. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa de Quiime2 (s. f.) usando dos bases de datos de comparación: una base de datos generada por el laboratorio de Micología del ISCIII obtenida a partir de las secuencias de ITS almacenadas en la base de datos Infoquest y otra pública, la base de datos Unite (Unite, s.f.).

RESULTADOS

Análisis de muestras ambientales

Durante el transcurso de este trabajo se realizaron dos campañas de captación ambiental durante los meses de julio y agosto. En cada campaña se recogió una muestra en Majadahonda y una en Villaverde. En la tabla 2 se recogen los datos referentes al recuento de colonias obtenido en las diferentes diluciones a partir de los cuatro filtros analizados de las diferentes campañas y localizaciones.

Tabla 2. Captación de muestras ambientales en Majadahonda y Villaverde. Cultivos y recuento de unidades formadoras de colonias.

IDENTIFICADOR	N	Fecha cultivo	DILUCIÓN	RECuento	UFC/ml	UFC/m ³
MAJA_19-07_4H_1025	2	19/07/2021	1	2	0,1	0,08333333
MAJA_19-07_4H_1025	2	19/07/2021	0,1	1	0,5	0,41666667
MAJA_19-07_4H_1025	2	19/07/2021	0,01	0	0	0
VILLA_19-07_4H_1015	2	19/07/2021	1	23	1,15	0,95833333
VILLA_19-07_4H_1015	2	19/07/2021	0,1	20	10	8,33333333
VILLA_19-07_4H_1015	2	19/07/2021	0,01	28	140	116,666667
MAJA_03-08_4H_0925	2	03/08/2021	1	10	0,5	0,41666667
MAJA_03-08_4H_0925	2	03/08/2021	0,1	1	0,5	0,41666667
MAJA_03-08_4H_0925	2	03/08/2021	0,01	0	0	0
VILLA_03-08_4H_1008	2	03/08/2021	1	6	0,3	0,25
VILLA_03-08_4H_1008	2	03/08/2021	0,1	1	0,5	0,41666667
VILLA_03-08_4H_1008	2	03/08/2021	0,01	0	0	0

Técnicas dependientes de cultivo

Se detectaron 92 colonias, pero solo se pudieron aislar 76 colonias de las cuatro muestras analizadas de las captaciones ambientales, de las cuales 53 fueron hongos filamentosos (69,74%) y 10 colonias catalogadas por MALDI-TOF como bacterias, la mayoría pertenecientes al género *Bacillus* (n= 8), principalmente *Bacillus subtilis* (n= 7) y las menos comunes fueron *Bacillus megaterium* (n= 1), *Yersinia enterocolitica* (n= 1) y *Staphylococcus hominis* (n= 1) (Figura 1). Un 10,86% de las colonias no se pudieron identificar por MALDI-TOF, pero por biología molecular 2 colonias fueron identificadas como *Aspergillus nidulans* y por identificación visual 5 se catalogaron como *Aspergillus sp.*, 2 como *A. fumigatus*, 1 como levadura, 1 como *Penicillium sp.* y otra como *A. nidulans*. A pesar de haber sido numeradas, 3 de las colonias no se pudieron separar para poder hacer una correcta identificación (anexo V).

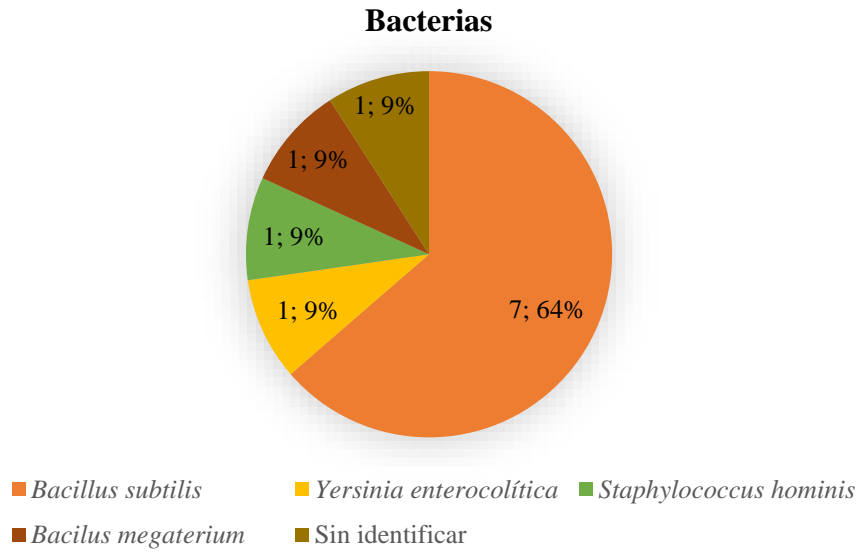


Figura 1. Bacterias identificadas por MALDI-TOF de todas las captaciones ambientales.

Los hongos más abundantes fueron *Aspergillus fumigatus* (n= 40), seguidos de *Aspergillus niger* (n= 5), *A. nidulans* (n =4), *Aspergillus ochraceus/westerdijkiae* (n= 1), *Rhizopus oryzae complex* (n= 1), *Paecilomyces variotii complex* (n= 1) y *Aspergillus spinulosporus* (n= 1) (Figura 2).

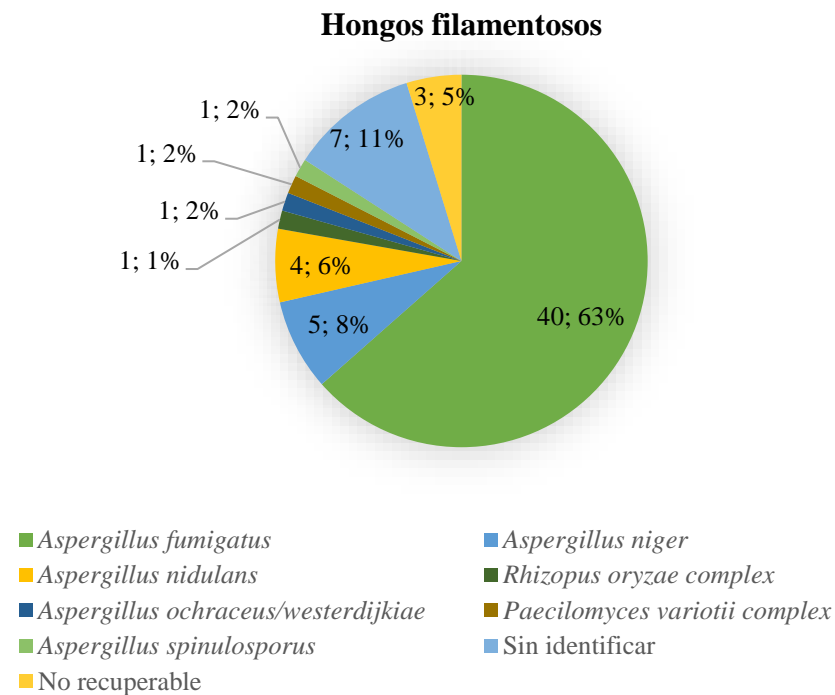


Figura 2. Hongos filamentosos identificados por MALDI-TOF y/o por biología molecular en las captaciones ambientales.

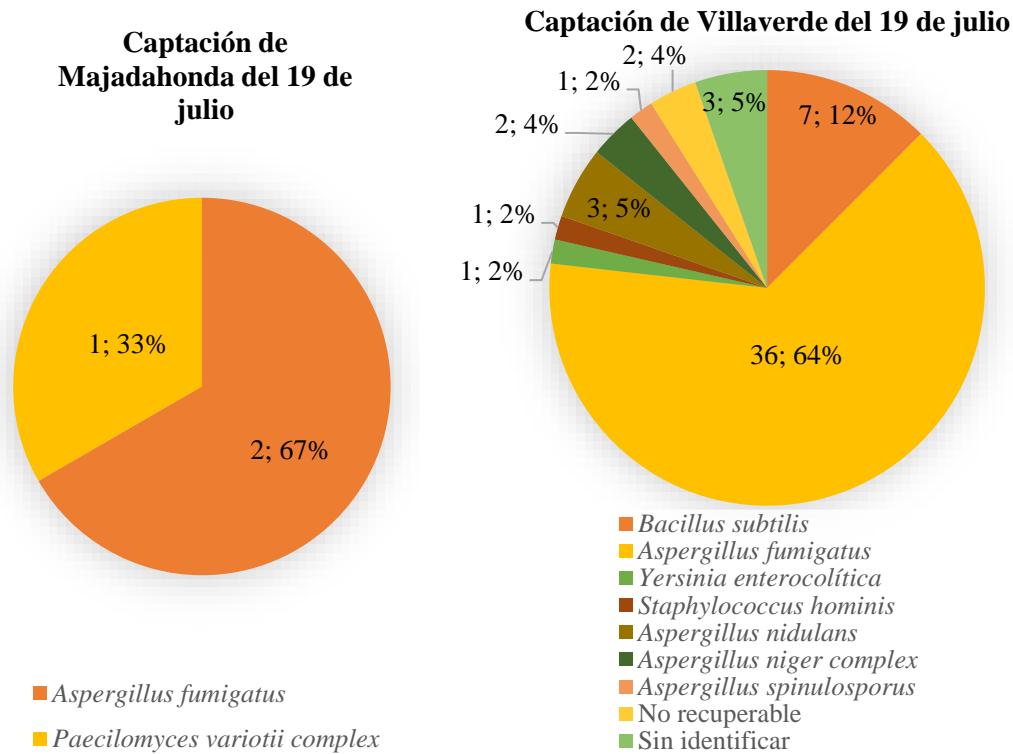


Figura 3. Colonias identificadas por MALDI-TOF y/o por biología molecular de las captaciones de julio.

Técnicas independientes de cultivo

Análisis de secuencias obtenidas por NGS

En paralelo al análisis de las muestras ambientales mediante las técnicas de cultivo se estandarizó la metodología para conocer la composición de hongos de las muestras liofilizadas a partir de las captaciones ambientales y de los esputos, mediante NGS.

Tras la extracción del ADN de las muestras de composición desconocida y de las muestras control, estas se visualizaron en un gel de agarosa (Figura 4) y se cuantificó la concentración de ADN mediante Nanodrop (Tabla 3) y Quantifluor (Tabla 4).

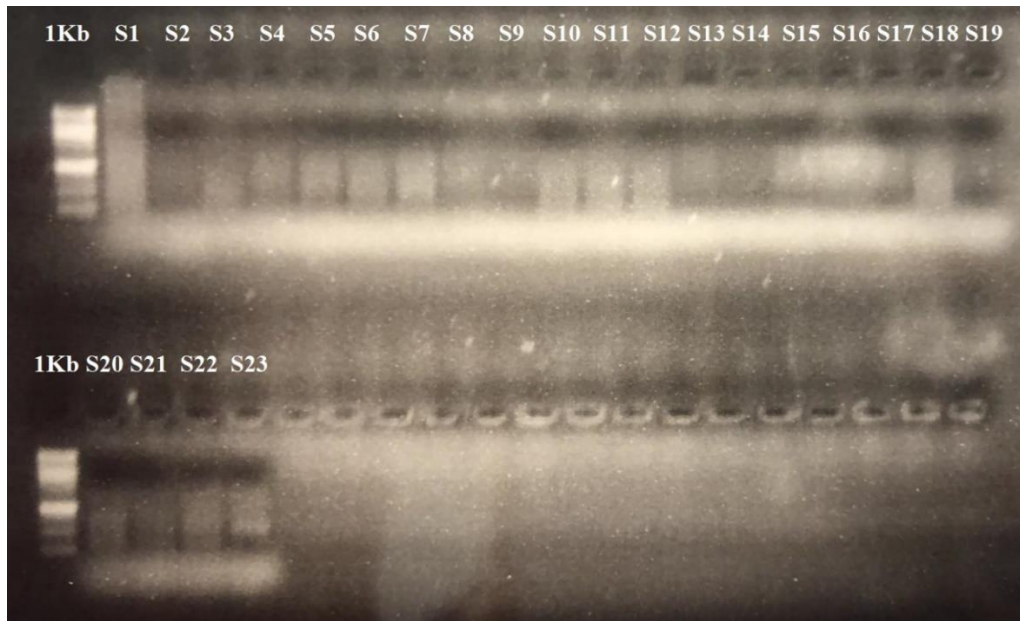


Figura 4. Gel de electroforesis de la extracción.

Tabla 3. Resultados en Nanodrop de la extracción, la amplificación de las regiones ITS y la purificación.

ID	Extracción (ng/μl)	Amplificación ITS (ng/μl)	Purificación (ng/μl)
S1: Esputo 1	3748,4	737,3	187,4
S2: Esputo 2	19,3	545,4	5,9
S3: Esputo 3	0	526,7	3,6
S4: Esputo 4	0	538,2	10,9
S5: Esputo 5	2,6	524,8	2
S6: Filtro con esporas 1	0	562,7	0,9
S7: Filtro con esporas 2	0	523,8	4,1
S8: Maja 1503-1	0	508,7	8,5
S9: Maja 1503-2	0	541	3,8
S10: Control negativo extracción	0	478	11,2
S11: Control positivo extracción	0	487,9	2,9
S12: Esputo 6	20,3	557	3,6
S13: Esputo 7	205	547,7	1,5
S14: Esputo 8	0,3	546,6	0,4
S15: Esputo 9	40	419,2	7,8
S16: Esputo 10	51,2	496	13,6
S17: Maja 1503-3	0	523,5	3,1
S18: Maja 1503-4	0	547,2	3,2
S19: Maja 1907	0	524,6	2,1
S20: Villa 1907	0	528	5,4
S21: Control positivo extracción	0	536	1,5
S22: Control negativo extracción	0	0	0
S23: Control positivo PCR	-	1698,4	56,9

Tabla 4. Resultados en Quantifluor de la amplificación de las regiones ITS.

ID	Amplificación ITS (ng/μl)
S1: Esputo 1	66
S2: Esputo 2	26
S3: Esputo 3	16,2
S4: Esputo 4	30
S5: Esputo 5	22
S6: Filtro control 1	26
S7: Filtro control 2	20
S8: Maja 1503-1	18,2
S9: Maja 1503-2	1,548
S10: Control negativo extracción	22
S11: Control positivo extracción	18,6
S12: Esputo 6	17
S13: Esputo 7	22
S14: Esputo 8	0,808
S15: Esputo 9	24
S16: Esputo 10	6,84
S17: Maja 1503-3	11,8
S18: Maja 1503-4	12,8
S19: Maja 1907	0,434
S20: Villa 1907	20
S21: Control positivo extracción	11,2
S22: Control negativo extracción	22
S23: Control positivo PCR	36

También se comprobó la concentración del ADN mediante Nanodrop tras la amplificación de las regiones ITS y tras la purificación de los productos amplificados (Tabla 3) y se cuantificaron por Quantifluor la amplificación de las regiones ITS y el indexado (Tabla 5). Se hizo, además, un gel de electroforesis de la amplificación de ITS (Figura 5) y del indexado (Figura 6).

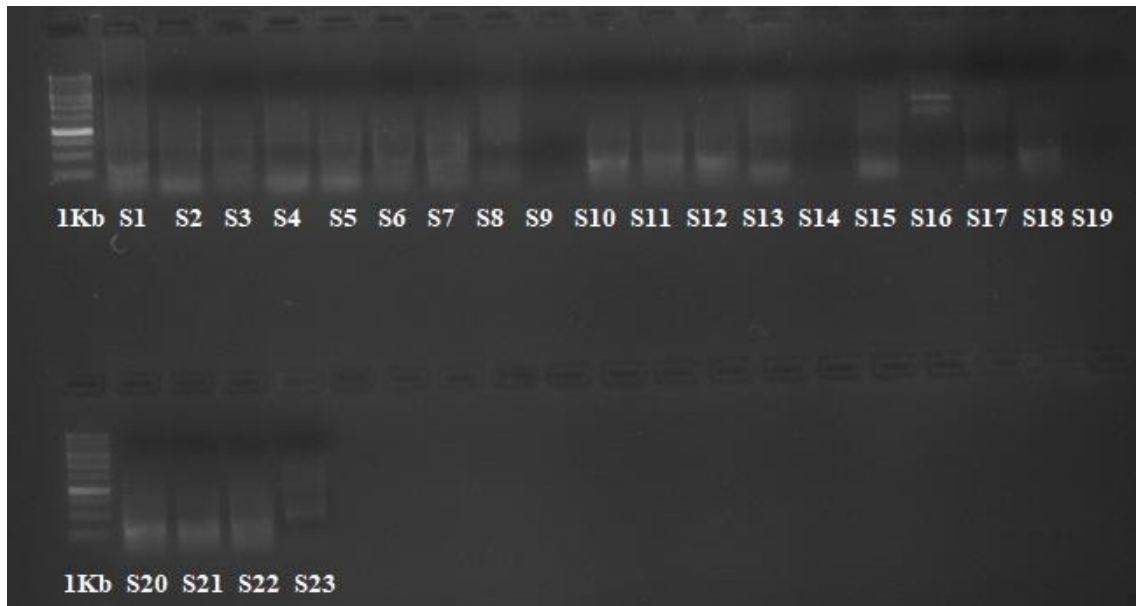


Figura 5. Gel de electroforesis de la amplificación de ITS.

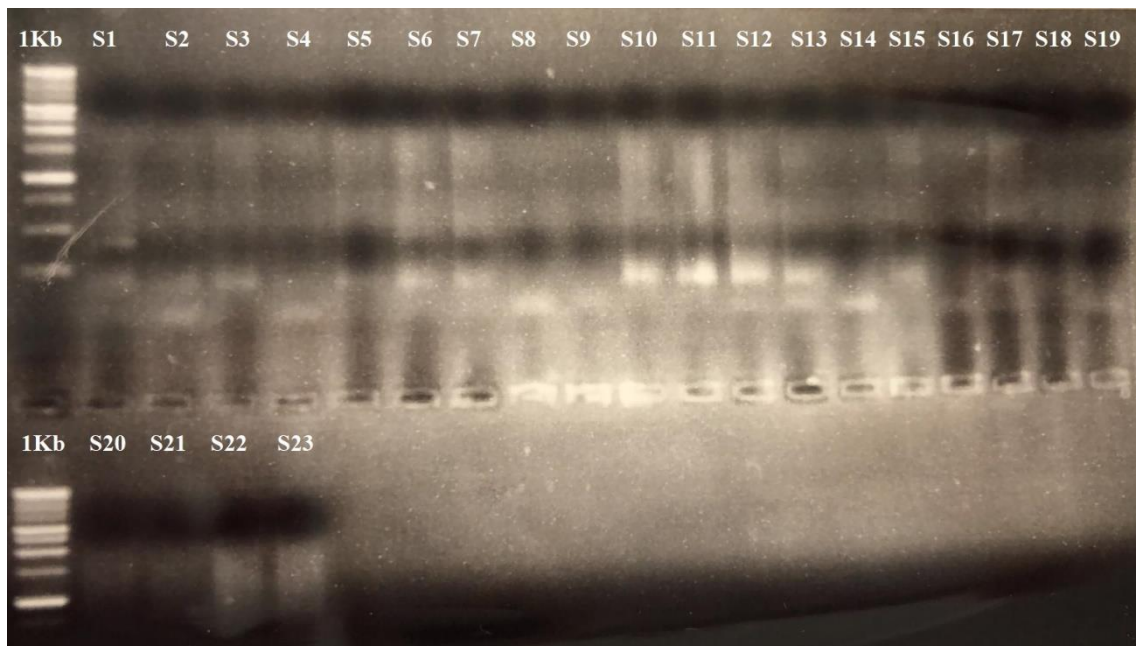


Figura 6. Gel de electroforesis del indexado.

Tabla 5. Resultados en Quantifluor de las muestras tras el indexado.

ID	Indexado (ng/μl)	ID	Indexado (ng/μl)
S1: Esputo 1	28	S13: Esputo 7	18
S2: Esputo 2	15	S14: Esputo 8	3,24
S3: Esputo 3	23	S15: Esputo 9	20
S4: Esputo 4	13	S16: Esputo 10	3,56
S5: Esputo 5	26	S17: Captación MAJA 1503-3	14
S6: Filtro+esporas 1	27	S18: Captación MAJA 1503-4	7,7
S7: Filtro+esporas 2	27	S19: Captación MAJA 1907	3,69
S8: Captación MAJA 1503-1	6,4	S20: Captación VILL 1907	30
S9: Captación MAJA 1503-2	1,73	S21: Control positivo extracción	20
S10: Control negativo extracción	30	S22: Control negativo extracción	37
S11: Control positivo extracción	41	S23: Control positivo PCR	31
S12: Esputo 6	25	Pool	19

Análisis del microbioma ambiental y pulmonar

Todas las muestras junto a los controles se secuenciaron con el secuenciador Miseq de Illumina. Tras su análisis bioinformático se obtuvo la composición de especies fúngicas para cada una de las muestras (Figura 7).

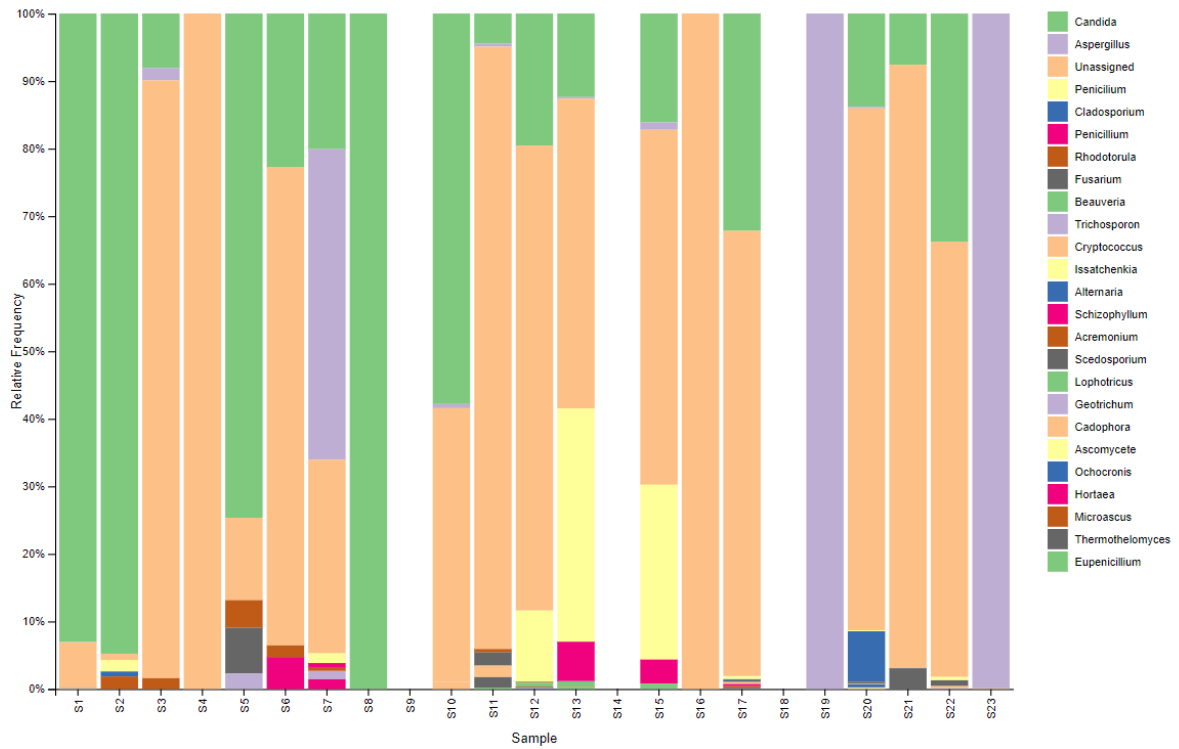


Figura 7. Gráfico de barras taxonómico de muestras ambientales, clínicas y controles introducidos en Qiime2. En el eje Y está representada la frecuencia relativa por género y en el X las muestras (s. f.).

En 3 muestras (MAJA 1503-3, esputo 8 y MAJA 1503-4) no se obtuvieron suficientes lecturas para realizar este análisis.

En las figuras 8, 9 y 10 están representadas las frecuencias relativas por género de las muestras de las captaciones ambientales, las muestras clínicas y los controles utilizados. Los géneros que están representados en dichas figuras son *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, otros géneros y aquellos a los que no se les asignó ningún género (*Unassigned*).

Frecuencia relativa (%)

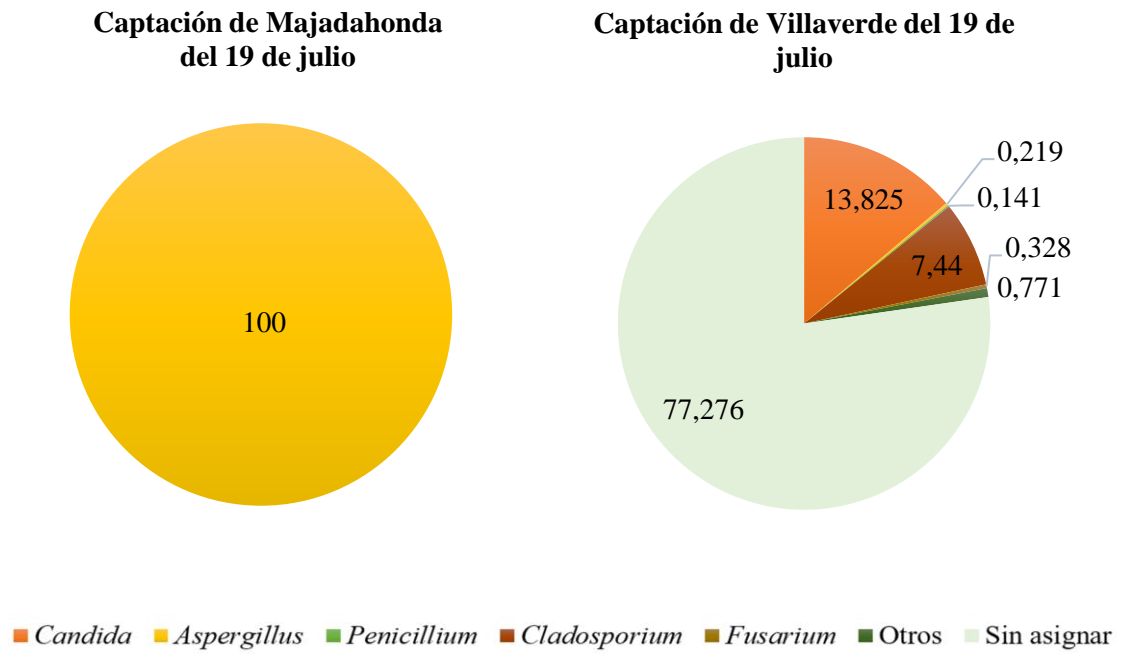


Figura 8. Frecuencia relativa en porcentaje por género de los microorganismos de las captaciones ambientales.

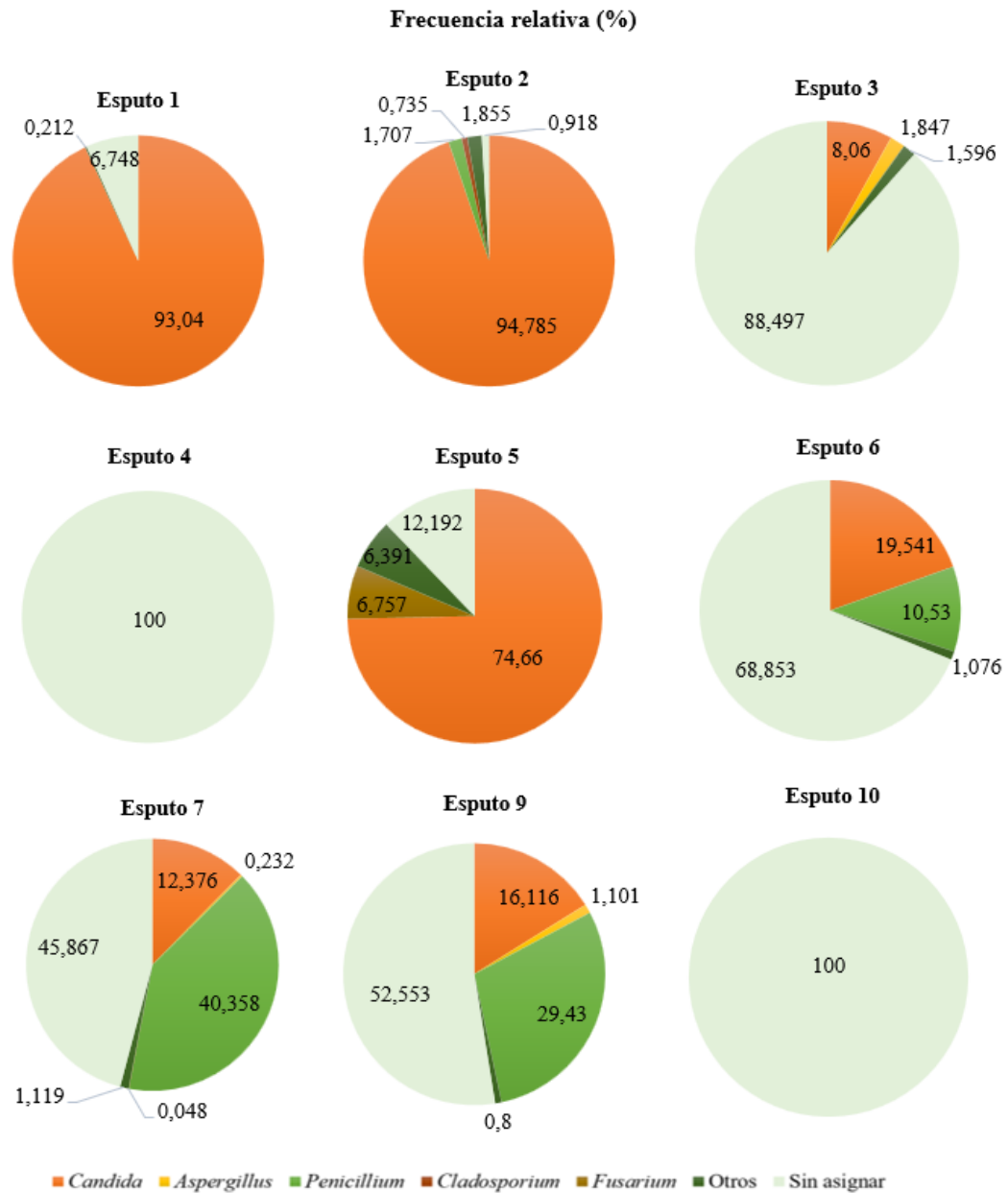


Figura 9. Frecuencia relativa en porcentaje por género de los microorganismos de las muestras clínicas.

Se observa un alto porcentaje de *Candida* en los esputos estudiados, así como de géneros sin identificar. Sólo se detectó *Aspergillus* en dos esputos (esputo 3 y esputo 9) con un porcentaje de entre el 1 y el 2%. El género *Penicillium* se encontró en los esputos 6 (10,53%), 7 (40,358%), 2 (1,707%) y 9 (29,43%).

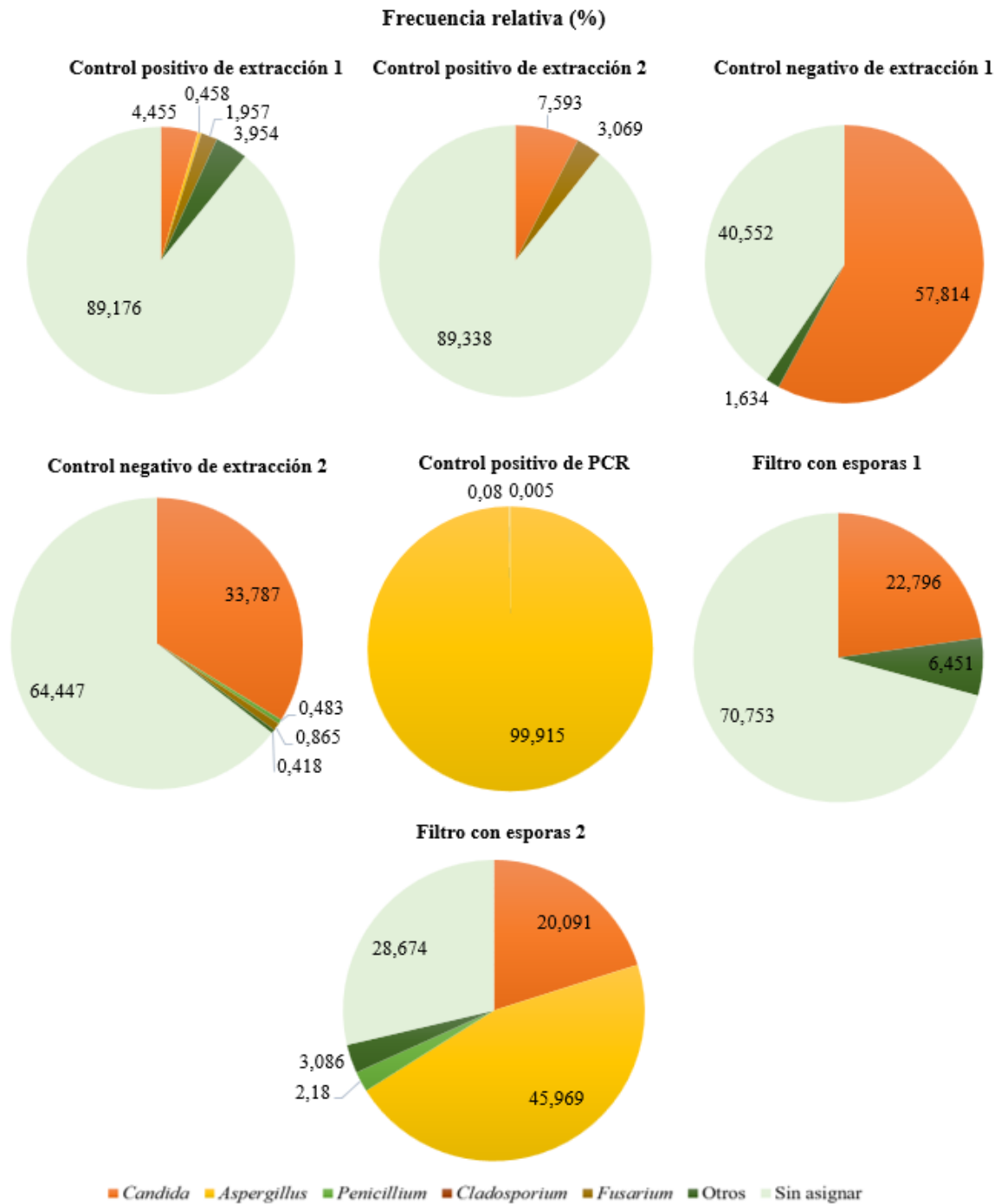


Figura 10. Frecuencia relativa en porcentaje por género de los microorganismos de los controles utilizados en el estudio de muestras clínicas.

En todos los controles utilizados, exceptuando el control de PCR, se observa un alto porcentaje de géneros sin identificar (28,674-89,338%) y un porcentaje relativamente alto de *Candida*. En la tabla 6 están representados los resultados esperados de los controles frente a los resultados obtenidos por NGS.

Tabla 6. Resultados esperados de los controles frente a los resultados obtenidos por NGS.

CONTROLES	RESULTADO ESPERADO	RESULTADO OBTENIDO
Control positivo de extracción 1	<i>A. fumigatus</i>	4,455% <i>Candida</i>
		0,458% <i>A. fumigatus</i>
		1,957% <i>Fusarium</i>
		3,954% Otros
		89,176% Sin asignar
Control positivo de extracción 2	<i>A. fumigatus</i>	7,593% <i>Candida</i>
		3,069% <i>Fusarium</i>
		89,338% Sin asignar
Control negativo de extracción 1	Ningún microorganismo	57,814% <i>Candida</i>
		1,634% Otros
		40,552% Sin asignar
Control negativo de extracción 2	Ningún microorganismo	33,787% <i>Candida</i>
		0,483% <i>Penicillium</i>
		0,865% <i>Fusarium</i>
		0,418% Otros
		64,447% Sin asignar
Control positivo de PCR	<i>A. niger</i>	99,915% <i>Aspergillus</i>
		0,005% Otros
		0,08% Sin asignar
Filtro con esporas 1	<i>A. flavus</i>	22,796% <i>Candida</i>
		6,451% Otros
		70,753% Sin asignar
Filtro con esporas 2	<i>A. fumigatus</i>	20,091% <i>Candida</i>
		45,969% <i>Aspergillus</i>
		2,18% <i>Penicillium</i>
		3,086% Otros
		28,674% Sin asignar

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones para el estudio del microbioma a partir de muestras ambientales y muestras humanas pulmonares.

La obtención de muestras ambientales se hizo con un equipo de muestreo cuya especificación técnica ha sido aprobada por el CEN (Comité Europeo de Normalización) (AENOR, 2013) y los parámetros de caudal, volumen de aire (12m³) y tiempo de captación (4h) están fijados y se mantienen en todos los experimentos igual, de modo que las variables que pueden modificar la captación son el clima y si el ambiente es urbano, semiurbano o rural. En todo momento el filtro es manipulado con guantes y se intenta mantenerlo estéril hasta el momento que comienza la captación. En un estudio similar utilizan muestreadores ciclónicos, que generan un flujo de aire que deposita las partículas en tubos Eppendorf (Nerea Abrego et al., 2018), aunque también puede usarse un sistema de enriquecimiento por concentración de aerosoles versátil (VACES: *Versatile aerosol concentration enrichment system*) (Seongheon Kim et al., 2001), que recoge biopartículas en función de su tamaño. En este trabajo hemos utilizado la metodología disponible, aunque no sea la más exacta el objetivo es detectar variaciones estacionales y entre ambientes por lo que creemos que esta aproximación es apropiada.

En este trabajo se sembraron distintas diluciones del filtro usado en el muestreo, como era de esperar, en las placas sin diluir se encontró un mayor número de colonias que en las diluidas. El recuento total de colonias fue 92, es mayor al número total de colonias que se estudió posteriormente por técnicas dependientes de cultivo (n= 76). Por tanto, es importante tener en cuenta el tiempo de incubación de las muestras y aislar las colonias en cuanto se ve crecimiento y no dejarlo más de 48h ya que a partir de ese momento nos resultó complicado recuperar las colonias y a eso creemos que se puede deber el alto porcentaje de cepas irrecuperables (por problemas de contaminación).

De las muestras ambientales estudiadas por técnicas dependientes de cultivo se analizaron 76 colonias, 53 fueron identificadas como hongos filamentosos, de las cuales 40 fueron identificadas como *Aspergillus fumigatus* y 8 no fueron identificadas ni por MALDI-TOF ni por biología molecular. Tan sólo 10 colonias del total fueron identificadas como bacterias, siendo la predominante *Bacillus subtilis*, lo cual es lógico dado que esta bacteria forma esporas (Takashi Tsugukuni et al., 2020).

En la captación de Majadahonda del 19 de julio (n= 3), mediante técnicas dependientes de cultivo se identificaron 2 colonias como *A. fumigatus* y 1 como *Paecilomyces variotii complex*, mientras que por NGS el 100% de las colonias fueron identificadas como *A. nidulans*. Estas diferencias pueden deberse a la base de datos de comparación y/o también a que la región que se utiliza para la secuenciación masiva no es suficientemente discriminativa en *Aspergillus*. Sería interesante incluir una segunda diana de amplificación en el proceso de NGS para caracterizar mejor las secuencias de *Aspergillus* obtenidas.

Respecto a la captación de Villaverde del 19 de julio (n= 56), se identificaron por técnicas dependientes de cultivo un 75% de colonias pertenecientes al género *Aspergillus*, de las cuales, un 64% fueron *A. fumigatus*, un 12% fueron *Bacillus subtilis*, un 2% *Yersinia enterocolítica*, un 2% *Staphylococcus hominis*, un 5% no se identificaron y un 4% no fueron recuperables. Sin embargo, por NGS se detectó un 0,219% de *Aspergillus*, un 13,825% de *Candida*, un 7,44% de *Cladosporium*, un 0,328% de *Fusarium*, el 0,771% fueron identificadas con otros géneros fúngicos y al 77,276% no se le asignó ningún género. Como era de esperar, la técnica basada en NGS detecta más variedad de géneros que por métodos dependientes de cultivo y es mucho más difícil de contaminar, de modo que el 64% de *A. fumigatus* detectados por métodos dependientes de cultivo podrían indicar una contaminación o un mejor crecimiento en las condiciones indicadas, también hay que señalar que hubo un porcentaje de cepas no despreciable que no se pudieron recuperar para su identificación lo que también podría explicar las diferencias. Por NGS un 77,276% de colonias no se pudieron identificar, lo que podría deberse a que las bases de datos no incluyen todas las especies de hongos existentes.

El protocolo de extracción de ADN a partir de esputos es complejo y requiere tiempo, pues hay que liofilizar las muestras durante más de 12 horas y tienen una matriz más complicada de tratar. Usar controles en el proceso de extracción es importante para comprobar que ha salido la extracción, de modo que se emplea como control negativo el ditiotreitól al 0,1% (DTT), al ser un detergente utilizado en la extracción y se usa como control positivo de la extracción de muestras ambientales un filtro idéntico al empleado en la captación ambiental con esporas de cepas de *Aspergillus* (ATCC2579 y ATCC2580). Aunque los resultados de la cuantificación de la extracción de ADN fueron muy bajos, sí se observaron productos de amplificación cuando las muestras se visualizaron por electroforesis (Figuras 4, 5 y 6).

Los resultados obtenidos de la secuenciación por NGS de las muestras clínicas, mostraron 2 esputos que tienen el 100% de la muestra sin identificar, 4 que tienen más del 50% sin identificar y 3 que tienen 12,192% o menos de sus géneros sin asignar, esto pone de manifiesto la necesidad de completar las bases de datos ya que es probable que estas sean secuencias de hongos que no se encuentran en las mismas. Los porcentajes de *Candida* en los esputos varían del 0%, en el caso de los esputos 4 y 10 no se asignó ningún microorganismo (100% sin asignar), hasta el 94,785%, esto podría indicar una contaminación con flora del tracto respiratorio superior ya que *Candida* se encuentra en la boca, pudiendo representar microbiota oral.

Respecto a los controles, los controles positivos de extracción utilizados fueron una cepa de *A. fumigatus*, sin embargo, las frecuencias relativas para este hongo en ambos controles por NGS resultaron ser del 0%. El control negativo de la primera extracción tenía únicamente DTT 0,1% pero el estudio por NGS dio un 57,814% de frecuencia relativa para hongos del género *Candida* y un 1,634% de otros géneros fúngicos. Algo similar ocurre con el control negativo de la segunda extracción, ya que detectó un 33,787% de *Candida* y unos porcentajes mínimos de otros microorganismos. Esto puede deberse a alguna contaminación en alguno de los pasos realizados. Sin embargo, el control positivo de PCR (DNA de *A. niger*) fue clasificado como *Aspergillus* como se esperaba. Por último, los resultados de los filtros con esporas son dispares, pues el primer filtro, que contenía la ATCC2579 (*A. flavus*), dio por NGS un 22,796% de *Candida*, un 6,451% de otros géneros fúngicos y un 70,753% de microorganismos sin identificar, pero no detectó *Aspergillus*, mientras que, en el segundo filtro, que contenía la ATCC2580 (*A. fumigatus*), se detectó un 45,969% de *Aspergillus*, un 20,091% de *Candida*, un 2,18% de *Penicillium*, un 3,086% de otros géneros y un 28,674% de microorganismos sin identificar. Estos resultados indican la necesidad de refinar el proceso de extracción y controlar en mayor medida las contaminaciones.

CONCLUSIONES

1. *Aspergillus* es el hongo filamentoso más comúnmente encontrado en los estudios ambientales por técnicas dependientes de cultivo, y concretamente, *A. fumigatus*.
2. *Candida* fue encontrada principalmente en las muestras clínicas posiblemente reflejando una contaminación de la microbiota oral.
3. Los controles de extracción no dieron los resultados esperados por lo que es necesario realizar más experimentos para determinar las causas del problema.
4. Las técnicas NGS son más precisas y pueden dar más información acerca de las frecuencias relativas de las diferentes poblaciones fúngicas en una muestra, pueden contaminarse fácilmente y son dependientes de la base de datos de comparación.
5. Las diferencias obtenidas en el estudio de las muestras ambientales mediante técnicas dependientes de cultivo frente a las técnicas NGS podrían deberse a la limitación del uso de la región ITS, que no es suficientemente discriminativa para algunas especies de hongos, para solventar este problema se podría añadir una segunda diana en el proceso de amplificación NGS.

ANEXOS

ANEXO I: Equipo de muestreo

El equipo de captación de muestras ambientales consta de un puerto donde se coloca el cabezal de muestreo de aerosoles, en el cual se coloca el portafiltros con su filtro correspondiente para la captación ambiental, una bomba de vacío que asegura el caudal constante para que la operación sea continua, un medidor de volumen de gas que determina el volumen aspirado, un cronómetro para ajustar el tiempo deseado de muestreo y una carcasa protectora (AENOR, 2013).



Figura 1. Equipo de muestreo empleado en las captaciones ambientales.

ANEXO II: Método de extracción de ADN a partir de cultivo para hongos filamentosos

Para la extracción primero se sembraron las muestras en medio líquido GYEP (Glucosa, extracto de levadura, peptona), una vez crecidas, se dejaron secar y se transfirió todo el micelio obtenido a un tubo Falcon de propileno de 50ml con tapón de rosca y fondo en cono al que se le han añadido 6 perlas de vidrio de 4mm de diámetro.

Los pasos de la extracción fueron los siguientes:

1. Se hicieron 3 ciclos de 30 segundos en N₂ líquido seguidos de 30s en vortex a máxima velocidad para pulverizar las muestras.
2. Se añadieron 800µl de tampón de extracción y 800µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico dentro de una cabina de gases.
3. Se transfirió el contenido a tubos eppendorf y se centrifugaron durante 15min a 12.000rpm entre 4-8°C.
4. Se traspasó el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se añadió la misma cantidad recogida de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.
5. Se repitió el proceso de centrifugación con las mismas condiciones y se traspasó el sobrenadante a un nuevo eppendorf, donde se añadió un volumen igual al recogido de cloroformo: alcohol isoamílico (Cl: 24:1).
6. Se hizo una centrifugación de 5min a 12.000rpm entre 4-8°C.
7. Se volvió a pasar el sobrenadante a un nuevo eppendorf y se precipitó con 0,6 volúmenes/ml de isopropanol, el contenido se mezcló por inversión y se centrifugó durante 15min a 12.000rpm.
8. El sobrenadante se retiró por aspiración y se añadieron 300µl de etanol (EtOH) al 70%.
9. Se centrifugó 10min a 12.000rpm entre 4-8°C.
10. Se volvió a retirar el sobrenadante por aspiración y se resuspendieron los pellets en 25-50 µl de agua destilada estéril y 1-2 µl de RNAsa (1mg/ml).
11. Se incubó durante 1h a 37°C.

ANEXO III: Condiciones de PCR de β -tubulina

La mezcla de reacción de la PCR estuvo constituida por 5 μ l de tampón sin cloruro de magnesio (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), 4 μ l de cloruro de magnesio (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), 1 μ l de desoxinucleósidos trifosfato al 2,5mM (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 1 μ l de cebador forward y 1 μ l de cebador reverse al 50mM correspondientes a β -tubulina 2a (5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3') y β -tubulina 2b (5'ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC3') (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), 0,5 μ l de Taq polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), 32,5 μ l de agua destilada (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) por cada muestra y 5 μ l de ADN a una concentración de 5ng/ μ l para dar un volumen final de 50 μ l.

La PCR consistió en un primer ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 2 minutos a 72°C y un ciclo final de 5 minutos a 72°C.

ANEXO IV: Cebadores e índices de Illumina utilizados para el estudio de muestras clínicas

Tabla 1. Set de cebadores forward (Illumina, 2019).

NOMBRE	SECUENCIA 5'
ITS_fwd_1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_2	CTCGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_3	CTTGGTCATTTAGAGGAACTAA
ITS_fwd_4	CCCGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_5	CTAGGCTATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_6	CTTAGTTATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_7	CTACGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS_fwd_8	CTTGGTCATTTAGAGGTCGTAA

Tabla 2. Set de cebadores reverse (Illumina, 2019).

NOMBRE	SECUENCIA 5'
ITS_rev_1	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS_rev_2	GCTGCGTTCTTCATCGATGG
ITS_rev_3	GCTACGTTCTTCATCGATGC
ITS_rev_4	GCTGCGTTCTTCATCGATGT
ITS_rev_5	ACTGTGTTCTTCATCGATGT
ITS_rev_6	GCTGCGTTCTTCATCGTTGC
ITS_rev_7	GCGTTCTTCATCGATGC

Tabla 3. Secuencias de los índices. N o S: Nextera XT; 7: Índice 1; 5: Índice 2 (Illumina, 2019).

Índice 1	Secuencia	Índice 2	Secuencia
N701	TAAGGCGA	S502	CTCTCTAT
N702	CGTACTAG	S503	TATCCTCT
N703	AGGCAGAA	S505	GTAAGGAG
N704	TCCTGAGC	S506	ACTGCATA
N705	GGACTCCT	S507	AAGGAGTA
N706	TAGGCATG	S508	CTAAGCCT
N707	CTCTCTAC	S510	CGTCTAAT
N710	CGAGGCTG	S511	TCTCTCCG
N711	AAGAGGCA	S513	TCGACTAG
N712	GTAGAGGA	S515	TTCTAGCT
N714	GCTCATGA	S516	CCTAGAGT
N715	ATCTCAGG	S517	GCGTAAGA
N716	ACTCGCTA	S518	CTATTAAG
N718	GGAGCTAC	S520	AAGGCTAT
N719	GCGTAGTA	S521	GAGCCTTA
N720	CGGAGCCT	S522	TTATGCGA
N721	TACGCTGC		

ANEXO V: Resultados de la identificación de las muestras ambientales

En las tablas 1, 2, 3 y 4 se recogen los datos obtenidos de la identificación visual, por espectrometría de masas y usando como diana la β -tubulina de las muestras recogidas en las captaciones ambientales.

Tabla 1. Captación de muestras ambientales en Majadahonda el día 19 de julio.

ID	IDENTIFICACIÓN VISUAL	MALDITOF	DIANA β -TUBULINA
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Paecilomyces variotii complex</i>	SIN IDENTIFICAR
3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Tabla 2. Captación de muestras ambientales en Villaverde el día 19 de julio.

ID	IDENTIFICACIÓN VISUAL	MALDITOF	DIANA β -TUBULINA
4	Levadura	<i>Bacillus subtilis</i>	-
5	Levadura	<i>Bacillus subtilis</i>	-
6	Levadura	<i>Yersinia enterocolítica</i>	-
7	Levadura	<i>Bacillus subtilis</i>	-
8	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
9	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger complex</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>
10	Levadura	<i>Staphylococcus hominis</i>	-
11	Levadura	<i>Bacillus subtilis</i>	-
12	NO RECUPERABLE	-	-
13	NO RECUPERABLE	-	-
14	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger complex</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>
15	<i>Aspergillus sp.</i>	SIN IDENTIFICAR	<i>Aspergillus spinulosporus</i>
16	Levadura	<i>Bacillus subtilis</i>	-
17	<i>Aspergillus nidulans</i>	SIN IDENTIFICAR	<i>Aspergillus nidulans</i>
18	SIN IDENTIFICAR	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
19	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
20	SIN IDENTIFICAR	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
21	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
22	SIN IDENTIFICAR	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
23	Levadura	<i>Bacillus subtilis</i>	-
24	Levadura	<i>Bacillus subtilis</i>	-
25	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
26	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
27	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
28	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
29	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
30	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
31	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
32	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
33	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-

34	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
35	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
36	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
37	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
38	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
39	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
40	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
41	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
42	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
43	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
44	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
45	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
46	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
47	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
48	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
49	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
50	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
51	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
52	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
53	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
54	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
55	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
56	<i>Aspergillus fumigatus</i>	SIN IDENTIFICAR	SIN IDENTIFICAR
57	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
58	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
59	<i>Aspergillus fumigatus</i>	SIN IDENTIFICAR	SIN IDENTIFICAR

Tabla 3. Captación de muestras ambientales en Majadahonda el día 3 de agosto.

ID	IDENTIFICACIÓN VISUAL	MALDITOF	DIANA β -TUBULINA
60	Levadura	<i>Bacillus megaterium</i>	-
61	<i>Aspergillus nigri</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
62	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus niger complex</i>	-
63	<i>Aspergillus sp.</i>	SIN IDENTIFICAR	SIN IDENTIFICAR
64	<i>Aspergillus sp.</i>	SIN IDENTIFICAR	SIN IDENTIFICAR
65	<i>Aspergillus sp.</i>	SIN IDENTIFICAR	SIN IDENTIFICAR
66	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
67	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
68	<i>Aspergillus sp.</i>	SIN IDENTIFICAR	SIN IDENTIFICAR
69	<i>Penicillium sp.</i>	SIN IDENTIFICAR	SIN IDENTIFICAR

Tabla 4. Captación de muestras ambientales en Villaverde el día 3 de agosto.

ID	IDENTIFICACIÓN VISUAL	MALDITOF
70	Levadura	SIN IDENTIFICAR
71	<i>Aspergillus nigri</i>	<i>Aspergillus niger complex</i>
72	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
73	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus ochraceus/westerdijkae</i>
74	NO RECUPERABLE	-
75	<i>Mucoral</i>	<i>Rhizopus oryzae complex</i>
76	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>

BIBLIOGRAFÍA

- A. Alastruey-Izquierdo, E. Mellado, T. Peláez, J. Pemán, S. Zapico, M. Alvarez, J. L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, FILPOP Study Group. (2013). Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00383-13>.
- AENOR. (2013). *Calidad del aire ambiente. Medición de bioaerosoles. Parte 1: Determinación de esporas mediante sistemas de muestreo de filtros y análisis de cultivos* (p. 46). Asociación Española e Normalización y Certificación.
- Aidan K. Curran and David L. Hava. (2021). Allergic Diseases Caused by Aspergillus Species in Patients with Cystic Fibrosis. *Antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040357>
- bioMérieux España S.A. (s. f.). *Preparación de muestras*.
- Brett J. Green. (2019). Emerging Insights into the Occupational Mycobiome. *Current Allergy and Asthma Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0818-2>.
- C. M. Tang, J. Cohen and D. W. Holden. (1992). An Aspergillus fumigatus alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00891.x>.
- Danielle Weaver & Sara Gago & Michael Bromley & Paul Bowyer. (2019). The Human Lung Mycobiome in Chronic Respiratory Disease: Limitations of Methods and Our Current Understanding. *FUNGAL GENOMICS AND PATHOGENESIS*. <https://doi.org/10.1007/s12281-019-00347-5>
- David A. Relman. (2015). New Technologies, Human Microbe Interactions, and the Search for Previously Unrecognized Pathogens. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/344935>
- Dong Yan, Tao Zhang, Jing Su, Li-Li Zhao, Hao Wang, Xiao-Mei Fang, Yu-Qin Zhang, & Hong-Yu Liu and Li-Yan Yu. (2016). Diversity and Composition of Airborne Fungal Community Associated with Particulate Matters in Beijing during Haze and Non-haze Days. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00487>

- Emily S. Charlson, Joshua M. Diamond, Kyle Bittinger, Ayannah S. Fitzgerald, & Anjana Yadav, Andrew R. Haas, Frederic D. Bushman, and Ronald G. Collman. (2012). Lung-enriched Organisms and Aberrant Bacterial and Fungal Respiratory Microbiota after Lung Transplant. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0693OC>
- Illumina. (2017). *MiSeq™ System Velocidad y simplicidad para la resecuenciación selectiva y la secuenciación de genomas pequeños*. <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>
- Illumina. (2019). *Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol*.
<https://support.illumina.com/downloads/fungal-metagenomic-sequencing-demonstrated-protocol-1000000064940.html>
- Jian Wang, Fengqi Li and Zhigang Tian. (2017). Role of microbiota on lung homeostasis and diseases. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9151-1>
- Julian R. Marchesi and Jacques Ravel. (2015). The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome*. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Laura Tipton, Elodie Ghedin & Alison Morris. (2017). The lung mycobiome in the next generation sequencing era. *Virulence*. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1235671>
- Laurence Delhaes, Sébastien Monchy, Emilie Fréal, Christine Hubans, Julia Salleron, Sylvie Leroy, Anne Prevotat, Frédérick Wallet, Benoit Wallaert, Eduardo Dei-Cas, & Telesphore Sime-Ngando, Magali Chabé, Eric Viscogliosi. (2012). The Airway Microbiota in Cystic Fibrosis: A Complex Fungal and Bacterial Community—Implications for Therapeutic Management. *Plos one*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036313>
- Lijia Cui, Alison Morris and Elodie Ghedin. (2013). The human mycobiome in health and disease. *Genome Medicine*. <https://doi.org/10.1186/gm467>
- Malcolm Richardson, Paul Bowyer and Raquel Sabino. (2018). The human lung and *Aspergillus*: You are what you breathe in? *Medical Mycology*.
<https://doi.org/10.1093/mmy/myy149>

- Markus Hilty, Conor Burke, Helder Pedro, Paul Cardenas, Andy Bush, Cara Bossley, Jane Davies, & Aaron Ervine, Len Poulter, Lior Pachter, Miriam F. Moffatt, William O. C. Cookson. (2009). Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. *Plos one*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>
- Martina Oriano, Leonardo Terranova, Antonio Teri, Samantha Sottotetti, Luca Ruggiero, Camilla Tafuro, Paola Marchisio, Andrea Gramegna, Francesco Amati, Fabrizio Nava, Elisa Franceschi, Lisa Cariani, & Francesco Blasi and Stefano Aliberti. (2019). Comparison of different conditions for DNA extraction in sputum—A pilot study. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s40248-018-0166-z>
- Michelle G. Rooks and Wendy S. Garrett. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.42>
- Nerea Abrego, Veera Norros, Panu Halme, Panu Somervuo, Heini Ali- & Kovero, Otso Ovaskainen. (2018). Give me a sample of air and I will tell which species are found from your region: Molecular identification of fungi from airborne spore samples. *Molecular ecology resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12755>
- Patrick C. Seed. (2015). The Human Mycobiome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019810>
- Poornima Ramanan, MD, Nancy L. Wengenack, PhD, & Elitza S. Theel, PhD. (2017). Laboratory Diagnostics for Fungal Infections A Review of Current and Future Diagnostic Assays. *Clinics in Chest Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.013>
- S. Arunmozhi Balajee, Jennifer L. Gribskov, Edward Hanley, David Nickle, and Kieren A. Marr. (2005). *Aspergillus lentulus* sp. Nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*. <https://doi.org/10.1128/EC.4.3.625-632.2005>
- Seongheon Kim, Peter A. Jaques, Mingchih Chang, John R. Froines & and Constantinos Sioutas. (2001). Versatile aerosol concentration enrichment system (VACES) for simultaneous in vivo and in vitro evaluation of toxic effects of ultra-fine, fine and coarse

ambient particles Part I: Development and laboratory characterization. *Journal of Aerosol Science*. [https://doi.org/10.1016/S0021-8502\(01\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S0021-8502(01)00057-X)

Takashi Tsugukuni, Naofumi Shigemune, Motokazu Nakayama, & Takahisa Miyamoto. (2020). Morphological Changes in Spores during Germination in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *Biocontrol Science*. <https://doi.org/10.4265/bio.25.203>

Unite. (S.f.) Unite community. <https://unite.ut.ee/>

(S. f.). Qiime2 view. <https://view.qiime2.org/>