



## ORIGINAL

# Caracterización del microbioma nasofaríngeo en pacientes con enfermedad de Kawasaki<sup>☆</sup>



Judith Sánchez-Manubens<sup>a,b,c,d,\*</sup>, Desirée Henares<sup>d,e,f</sup>, Carmen Muñoz-Almagro<sup>e,f,g</sup>, Pedro Brotons de los Reyes<sup>e,f,g</sup>, Natalia Timoneda<sup>e,f</sup> y Jordi Antón<sup>a,d,h</sup>

<sup>a</sup> Sección de Reumatología Pediátrica, Servicio de Pediatría, Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona, España

<sup>b</sup> Unidad de Reumatología Pediátrica, Servicio de Pediatría, Hospital Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, España

<sup>c</sup> Servicio de Pediatría, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España

<sup>d</sup> Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IRSJD), Esplugues de Llobregat, Barcelona, España

<sup>e</sup> Unidad de Microbiología Molecular, Laboratorio, Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona, España

<sup>f</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, España

<sup>g</sup> Departamento de Medicina, Universitat Internacional de Catalunya, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, España

<sup>h</sup> Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

Recibido el 16 de julio de 2021; aceptado el 16 de noviembre de 2021

Disponible en Internet el 17 de junio de 2022

## PALABRAS CLAVE

Kawasaki;  
Microbioma;  
*Corynebacterium*;  
Microbioma  
respiratorio

## Resumen

**Introducción:** La etiología de la enfermedad de Kawasaki (EK) sigue siendo desconocida. Varios estudios han relacionado el microbioma humano con algunas enfermedades. Sin embargo, los estudios sobre el microbioma respiratorio en EK son limitados. Este estudio intenta profundizar en las causas y procesos que predisponen al desarrollo de la EK.

**Métodos:** Estudio de casos y controles en el que se compara el microbioma respiratorio de pacientes con EK con el de niños sanos. La región V3-V4 del gen bacteriano del ARNr 16S y 16 virus respiratorios se analizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Se utilizó la base de datos RDP (Ribosomal Database Project) versión 11.5 (asignación taxonómica).

**Resultados:** Se incluyeron 11 casos y 11 controles emparejados por edad, sexo y estacionalidad. Uno de los casos fue descartado por mala calidad de la muestra. El estudio final se realizó a 10 casos y 10 controles. En el grupo de casos se encontraron *Haemophilus*, *Moraxella*, *Streptococcus* y *Corynebacterium* (27,62%, 19,71%, 25,28% y 11,86%, respectivamente). En el grupo control, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Moraxella* y *Dolosigranulum* (38,59%, 23,71%, 16,08 y 8,93%, respectivamente). *Corynebacterium* mostró una mayor abundancia en pacientes con EK (11,86% vs. 1,55%;  $p = 0,004$ ).

<sup>☆</sup> Este trabajo fue presentado en el XIII Congreso de la Sociedad Española de Reumatología Pediátrica (SERPE) (Madrid, España; noviembre del 2019) y el Congreso Euro-KiDs 2021 (encuentro en línea; enero del 2021).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [judith.sanchezm@sjd.es](mailto:judith.sanchezm@sjd.es) (J. Sánchez-Manubens).

**Conclusiones:** Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que ha encontrado diferencias en la composición del microbioma respiratorio entre pacientes con EK y controles sanos. *Corynebacterium* spp. presentó una mayor abundancia en el grupo de EK. Este estudio muestra diferencias en el microbioma entre pacientes y controles, lo que sugiere un papel facilitador del microbioma en el desarrollo de la EK.

© 2022 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## KEYWORDS

Kawasaki;  
Microbiome;  
*Corynebacterium*;  
Respiratory  
microbiome

## Characterization of the nasopharyngeal microbiome in patients with Kawasaki disease

### Abstract

**Introduction:** The aetiology of Kawasaki disease (KD) remains unknown. Several studies have linked the human microbiome with some diseases. However, there are limited studies on the role of the respiratory microbiome in KD. The aim of our study was to make a more thorough analysis of the causes and processes that increase the susceptibility to KD.

**Methods:** Case-control study comparing the respiratory microbiome of KD patients with that of healthy children. The V3–V4 region of the 16S rRNA bacterial gene and 16 respiratory viruses were analysed by real-time polymerase-chain reaction. We used the Ribosomal Database Project (RDP) version 11.5 (taxonomic assignment).

**Results:** The initial sample included 11 cases and 11 controls matched for age, sex and seasonality. One of the cases was excluded to poor sample quality. The final analysis included 10 cases and 10 controls. In the case group, the analysis detected *Haemophilus*, *Moraxella*, *Streptococcus* and *Corynebacterium* species (27.62%, 19.71%, 25.28%, 11.86%, respectively). In the control group, it found *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Moraxella*, and *Dolosigranulum* species (38.59%, 23.71%, 16.08, 8.93%, respectively). We found a higher relative abundance of *Corynebacterium* in patients with KD (11.86% vs. 1.55%;  $P = .004$ ).

**Conclusions:** To our knowledge, this is the first study that has found differences in the composition of the respiratory microbiome between patients with KD and healthy controls. The relative abundance of *Corynebacterium* spp. was greater in the KD group. This study shows differences in the microbiome between cases and controls, which suggests that the microbiome may play a role in facilitating the development of KD.

© 2022 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

La enfermedad de Kawasaki (EK) es una vasculitis sistémica, aguda y autolimitada de la infancia que afecta principalmente a lactantes y niños menores de 5 años. Su diagnóstico es clínico. Su pronóstico depende de la afectación cardíaca. Sin tratamiento, del 20 al 25% de los pacientes desarrollan aneurismas coronarios<sup>1</sup>.

La etiología de la EK se desconoce a pesar de años de investigación. Los hallazgos clínicos, de laboratorio y las características epidemiológicas de la enfermedad señalan un origen o desencadenante infeccioso. Hasta la fecha, numerosos estudios han fracasado en el intento de identificar un agente etiológico infeccioso o evidenciar una asociación con la exposición a medicamentos o la respuesta a un superantígeno. También se ha demostrado una importante predisposición genética a la EK. Algunos estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han identificado varios *loci* biológicamente plausibles, implicados en la inflamación, la respuesta inmunitaria y el estado cardiovascular<sup>2-4</sup>. En función del agrupamiento espacial o

temporal de casos, entre otros patrones, una hipótesis razonable es que la EK podría ser causada por un desencadenante (debatándose aún si sería un agente infeccioso) que solo produciría enfermedad o generaría una respuesta inmunológica en individuos con predisposición genética, especialmente de origen asiático<sup>1</sup>. En cambio, se sabe poco del impacto del microbioma humano en el desarrollo de la EK.

El término microbioma hace referencia a la comunidad de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que comparten el espacio corporal humano<sup>5</sup>. Varios estudios han relacionado el microbioma humano con algunas enfermedades o la predisposición a desarrollarlas. Algunos de ellos han investigado la asociación entre la desregulación del microbioma intestinal y múltiples enfermedades autoinmunes. Los modelos animales sugieren que el microbioma intestinal contiene organismos que dirigen respuestas inmunitarias proinflamatorias y antiinflamatorias según el contexto inmunológico, el genotipo o el sexo de huésped y la estructura general de la comunidad microbiana<sup>6</sup>.

En el campo de la Reumatología, el papel del microbioma humano se ha estudiado en enfermedades como la artritis reumatoide (AR) o el lupus eritematoso sistémico (LES). En el caso de la AR, se ha encontrado una asociación entre un aumento en la presencia de *Porphyromonas encialis*, un anaerobio oral involucrado en el desarrollo de la periodontitis y resultados positivos de anticuerpos antipeptido citrulinado cíclico<sup>7</sup>. También se han detectado alteraciones de la microbiota intestinal en la AR, con una expansión considerable de *Prevotella copri* en pacientes sin tratar con AR de inicio reciente<sup>8</sup>. El LES también se caracteriza por alteraciones microbianas. Uno de los primeros estudios encontró una diversidad bacteriana reducida y una ratio de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* inferior en pacientes con LES<sup>9</sup>. Al igual que en la AR, hay evidencia de una translocación de bacterias intestinales en el LES, con detección de *Enterococcus gallinarum* en biopsias hepáticas de pacientes con LES activo<sup>10</sup>.

Aunque el papel de la desregulación del microbioma intestinal en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes se ha estudiado extensamente, el papel del microbioma respiratorio en la autoinmunidad no está tan claramente establecido. Aunque no se ha identificado ningún agente causal infeccioso, algunos estudios epidemiológicos han descrito infecciones por diversos microorganismos en muchos pacientes con EK. Recientemente se han descritos casos con una presentación similar a la de la EK en asociación a la infección por SARS-CoV-2<sup>11,12</sup>. Por añadidura, el hecho de que ha habido epidemias de EK en Japón, su mayor incidencia en primavera e invierno y su ocurrencia predominantemente en niños de 6 meses a 5 años de edad apoyan la hipótesis de una etiología o desencadenante infeccioso<sup>1</sup>.

Hasta donde conocemos, los estudios sobre el microbioma respiratorio en la EK son limitados. Algunos estudios han buscado una relación entre la flora intestinal y faríngea con la EK y no encontraron diferencias significativas entre casos y controles<sup>13,14</sup>. En un estudio del microbioma intestinal en EK publicado en 2005 se analizó el microbioma fecal de 28 pacientes con EK, objetivándose un aumento en las especies de *Streptococcus* en la fase aguda de la enfermedad y en las bacterias del género *Ruminococcus* en la fase subaguda<sup>15</sup>. Avances recientes permitieron descubrir que la diferenciación de las células Treg y Th17 está regulada por ácidos grasos de cadena corta (AGCC), en particular el butirato, producidos por la microbiota intestinal. Este hallazgo apuntó a una relación mecanística entre la disbiosis, definida como cambios en la composición de la microbiota intestinal, y varias enfermedades inflamatorias. Estudios recientes han intentado corroborar esta hipótesis, objetivándose concentraciones fecales de butirato significativamente disminuidas en pacientes con EK, lo que supone una información importante en cuanto a la asociación entre la disbiosis y la respuesta inmune desregulada en la EK<sup>15-17</sup>.

Hallazgos ultraestructurales han sugerido la contribución de los virus a la patogénesis de la EK, habiéndose encontrado cuerpos de inclusión citoplasmáticos que contenían ARN de origen viral en el epitelio bronquial de pacientes con EK fallecidos<sup>18-20</sup>. Otros estudios han encontrado virus respiratorios en muestras de aspirado nasofaríngeo en aproximadamente la mitad de los pacientes con EK<sup>21</sup>.

Algunos trabajos han apuntado a una posible contribución de infecciones fúngicas en el desarrollo de la EK. Estudios

recientes<sup>22,23</sup> indican que el agente causal podría ser un agente ambiental transportado en vientos troposféricos. Sus autores encontraron toxinas aerosolizadas de varias especies de *Candida* en muestras recogidas de la troposfera en periodos de alta incidencia de EK. En Japón, el número de casos frecuentemente parece estar asociado con corrientes de aire provenientes de terrenos de cultivo intensivo de cereales en el noreste de China<sup>24,25</sup>. Por otro lado, Sato et al. observaron que sustancias derivadas de *Candida albicans*, como su fracción soluble en agua, inducían arteritis coronaria en ratones<sup>26</sup>.

La mayoría de los hallazgos publicados muestran que la composición del microbioma intestinal en pacientes con EK difiere de la de sujetos sanos<sup>16</sup>. Una hipótesis razonable para la patogénesis de la EK sería que, en individuos con predisposición genética y un microbioma favorable, un desencadenante externo podría facilitar el desarrollo de la enfermedad. Que conozcamos, ningún estudio ha caracterizado el microbioma encontrado en secreciones respiratorias en la EK.

El objetivo principal del estudio fue comparar las diferencias en la microbiota bacteriana nasofaríngea y en los virus respiratorios en pacientes con EK y controles sanos como primer paso para profundizar en el papel del microbioma y los antecedentes infecciosos en la patogénesis de EK.

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio de casos y controles incluyendo a niños diagnosticados de EK (casos) tratados en un hospital terciario (n = 11) emparejados con niños sanos (controles) atendidos en el mismo hospital que fueron tratados mediante pruebas de laboratorio antes de una cirugía menor o que acudieron a visitas de seguimiento en pediatría general (n = 11). Uno de los casos acabó excluyéndose debido a la baja calidad de la muestra. La muestra final incluyó 10 casos y 10 controles. Las muestras se recogieron entre febrero del 2016 y mayo del 2018. Los casos y controles se emparejaron por edad, sexo y estacionalidad. Para más información sobre la metodología, consultar el material suplementario.

Todos los pacientes se reclutaron en los 5 días que siguieron al diagnóstico y las muestras respiratorias se tomaron antes de iniciarse el tratamiento. Todos cumplieron los criterios diagnósticos de EK establecidos por la American Heart Association<sup>1</sup>. Se excluyó a pacientes que habían recibido antibioterapia antes de la toma de la muestra o para los que no se obtuvo el consentimiento informado por escrito. Los controles eran niños sanos sin comorbilidades importantes y que no habían recibido tratamiento antibiótico en las 4 semanas que precedieron a la toma de la muestra. Los conjuntos de datos presentados en este artículo se pueden consultar en repositorios en línea. El nombre del o los repositorios y el número o los números de acceso se detallan en el repositorio de Figshare dentro del proyecto Kawasaki: <https://figshare.com/s/181b728556419d0de4c5>.

## Obtención de muestras de aspirado nasofaríngeo

Se obtuvo una muestra de aspirado nasofaríngeo de cada paciente para su análisis. Para ello, se inyectaron de 2

a 3 ml de cloruro de sodio Meinsol® 9 mg/ml (Fresenius Kabi; Alemania) en la nasofaringe del paciente, para luego aspirar la solución y almacenarla en tubos estériles de 25 ml. Se almacenaron alícuotas en tubos Eppendorf de 1,5 lL (STARLAB International GmbH, Hamburgo, Alemania), que se congelaron de inmediato a  $-80^{\circ}\text{C}$ . También se procesaron 6 muestras de control (2-3 ml de cloruro de sodio Meinsol 9 mg/ml disolvente para uso parenteral [Fresenius Kabi España, S.A.U.]). Tanto las muestras clínicas como las de control fueron tratadas mediante el mismo protocolo de recogida, extracción, amplificación y secuenciación de ADN. Las muestras se procesaron en un laboratorio de diagnóstico clínico en áreas libres de ácidos nucleicos y en cabinas con flujo laminar tratadas con rayos UV, con reactivos y pipetas dedicados exclusivamente a este proceso.

### Extracción de ADN/ARN

La extracción de ADN de muestras de aspirado y controles negativos se realizó con el sistema Nuclisens® EasyMag® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (bioMérieux S.A. 69280 Marcy l'Etoile/France). Es un sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos basado en columnas de sílice con partículas magnéticas. Partiendo de una muestra con un volumen de  $400\ \mu\text{l}$ , se obtenía una elución con un volumen de  $25\ \mu\text{l}$ . A continuación, el ADN extraído se cuantificaba por medio del Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.), un método fluorométrico basado en la unión específica de colorantes fluorescentes al ADN bicatenario. La extracción de ADN/ARN para la detección de virus respiratorios se realizó con el sistema Magna Pure (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE. UU.), otro sistema de extracción automatizado basado en partículas magnéticas de sílice, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Estudio del microbioma mediante secuenciación de nueva generación (NGS)

La región V3-V4 del gen de la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S), de unos 465 pares de bases (pb), se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos y con las siguientes condiciones de amplificación:  $95^{\circ}\text{C}$  (3 min), seguido de 25 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  (30 s),  $55^{\circ}\text{C}$  (30 s),  $72^{\circ}\text{C}$  (30 s) y  $72^{\circ}\text{C}$  (5 min). A continuación, se procedió a fragmentar el ADN total de cada muestra, añadiéndose 2 índices y adaptadores de secuenciación con el Nextera XT Illumina Index Kit (Illumina, San Diego, California, EE. UU.) mediante PCR. Se realizó una segunda purificación con esferas magnéticas (Agencourt AMPure XP 60 ml kit, Beckman Coulter; Múnich, Alemania) antes de pasar a la cuantificación de la genoteca con el Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.). Se construyó una genoteca de clones de 300 pb por muestra. Se mezclaron cantidades equimolares de ADN de cada muestra y el conjunto resultante se secuenció con el sistema Illumina MiSeq (Illumina; San Diego, California, EE. UU.).

### Detección de virus respiratorios

Se utilizó una prueba de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) multiplex (Allplex Respiratory Panel Assays) para la detección de 16 virus respiratorios y 3 subtipos de influenza A que causan infecciones de las vías aéreas: influenza A (subtipos H1, H1pdm09 y H3), influenza B, virus respiratorio sincitial A y B, adenovirus, enterovirus, parainfluenzavirus 1, 2, 3 y 4, metapneumovirus, bocavirus, rinovirus, coronavirus NL63, coronavirus 229E y coronavirus OC43.

### Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk test. Los datos cuantitativos con distribución normal se describieron mediante la media y la desviación estándar (DE). Los grupos se compararon mediante la prueba de la t de Student en el caso de seguir una distribución normal y de lo contrario mediante la U de Mann-Whitney. Para la comparación de más de 2 grupos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. El contraste de hipótesis en variables cualitativas se realizó con el test exacto de Fisher. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

### Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del hospital. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las guías y legislación pertinentes, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes o sus tutores legales. El estudio se realizó en conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki.

### Resultados

#### Características de los pacientes

La muestra inicial incluyó a 11 pacientes con EK (6 varones y 5 mujeres), de los que uno fue excluido debido a la baja calidad de la muestra; los pacientes tenían de 6 a 81 meses de edad (mediana, 30 meses). Todos los pacientes cumplían los criterios diagnósticos de EK establecidos por la American Heart Association<sup>1</sup>. Todos los pacientes con EK recibieron inmunoglobulina por vía intravenosa (IGIV) en dosis de  $2\ \text{g/kg}$  como tratamiento inicial y solo 2 requirieron tratamiento adicional, como una segunda dosis de IGIV o corticoides. Las características clínicas y el tratamiento de los pacientes se presentan en la [tabla 1](#). Los casos y los controles se emparejaron por edad (año de nacimiento), sexo y estacionalidad (misma estación). Los controles eran niños sanos sin comorbilidades que acudieron al mismo hospital por seguimiento en pediatría general o previamente a una cirugía menor.

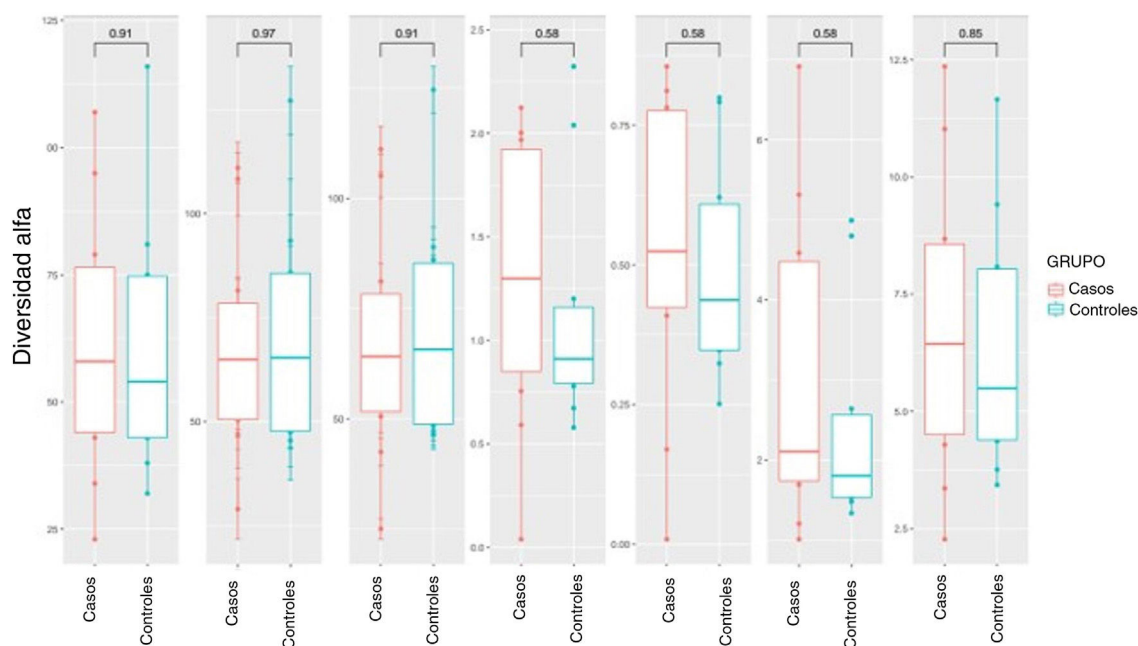
#### Análisis de diversidad alfa

La diversidad alfa se centra en el estudio de la diversidad dentro de una única comunidad (intramuestra). Para su medida se utilizan distintos parámetros, cada uno de los

**Tabla 1** Características de los pacientes con enfermedad de Kawasaki al ingreso

Paciente	Sexo	Edad	Fecha de inicio	Fecha de obtención de muestra	Subtipo de EK	Síntomas concomitantes	Afección coronaria al ingreso	Leucocitos totales (/mm <sup>3</sup> )	Plaquetas totales (/mm <sup>3</sup> )	Sodio (mmol/l)	VSG (mm/h)	PCR (mg/l)	Respuesta a la IGIV
P1	V	1 a 2 m	26 enero, 2016	2 febrero, 2016	I	Diarrea, vómitos	No	15.100	321.000	138	33	47,7	Sí
P2	V	1 a 10 m	1 febrero, 2016	8 febrero, 2016	C	-	No	23.300	849.000	133	44	24,8	Sí
P3	V	6 a 6 m	12 abril, 2016	22 abril, 2016	C		No	13.100	507.000	137	ND	17,8	Sí
P4	M	7 m	14 abril, 2017	19 abril, 2017	C	Piuria estéril	No	20.500	586.000	136	ND	110,3	Sí
P5	M	3 a 1 m	24 abril, 2017	29 abril, 2017	C	Piuria estéril	No	17.300	343.000	137	23	79,3	No
P6	V	6 m	3 julio, 2017	7 julio, 2017	C	-	No	19.800	449.000	136	54	301,5	Sí
P7	V	3 a 8 m	5 julio, 2017	9 julio, 2017	C	Vómitos	No	7.100	ND	130	ND	161,0	Sí
P8	M	9 m	4 julio, 2017	11 julio, 2017	I	Diarrea	Sí	30.900	636.000	134	32	204,0	Sí
P9	M	2 a 3 m	30 septiembre, 2017	9 octubre, 2017	I	Hepatomegalia	No	36.200	440.000	137	42	146,1	Sí
P10	M	3 a 8 m	18 mayo, 2018	24 mayo, 2018	C	SAM	No	3.000	154.000	138	ND	279,3	No

a: años; C: completa; I: incompleta; IGIV: inmunoglobulina por vía intravenosa; m: meses; M: mujer; ND: no documentado; PCR: proteína C reactiva; SAM: síndrome de activación macrofágica; V: varón; VSG: velocidad de sedimentación globular.



**Figura 1** Diversidad alfa: diagrama de caja de los distintos índices de diversidad y riqueza en los grupos de casos y de control. La línea horizontal en cada caja representa la mediana del conjunto de datos, los bordes de la caja los percentiles 25 y 75. El valor de p obtenido mediante la prueba de Wilcoxon se muestra encima de la caja.

cuales contribuye a explicar uno o más de sus componentes. Dentro del análisis de la diversidad alfa, se puede diferenciar entre la riqueza y la diversidad. La riqueza solo tiene en cuenta el número de géneros distintos contenidos en cada una de las muestras, mientras que la diversidad también tiene en cuenta la abundancia de estos géneros en las muestras. Se analizaron distintos índices de diversidad alfa tanto en casos como en controles, representándose por medio de diagramas de cajas (fig. 1). No se encontraron diferencias significativas ni en la riqueza ni en la diversidad.

### Composición taxonómica en los grupos de casos y de control y análisis de abundancia diferencial

Los géneros más frecuentes en el grupo de casos fueron *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Moraxella* y *Corynebacterium*, con abundancias relativas del 27,55, el 20,62, el 26,20 y el 12,25%, respectivamente. En comparación, el género dominante en el grupo control fue *Haemophilus*, seguido de *Streptococcus*, *Moraxella* y *Dolosigranulum* (el 38,83, el 24,21, el 16,79 y el 9,40%, respectivamente). La abundancia relativa del resto de los géneros identificados fue inferior al 4% (fig. 2) (tabla 2).

*Corynebacterium* spp. estaba sobrerrepresentado en el grupo con EK (12,25% vs. 1,59%;  $p = .045$ ). También se observó una proporción mayor de otros géneros con abundancias relativas inferiores a 0,5% en el grupo de casos en comparación con el grupo de control (16,07% vs. 7,82%;  $p = 0,08$ ).

### Análisis de diversidad beta

La diversidad beta se define como la diferencia en la diversidad de las especies entre comunidades (intermuestra) y

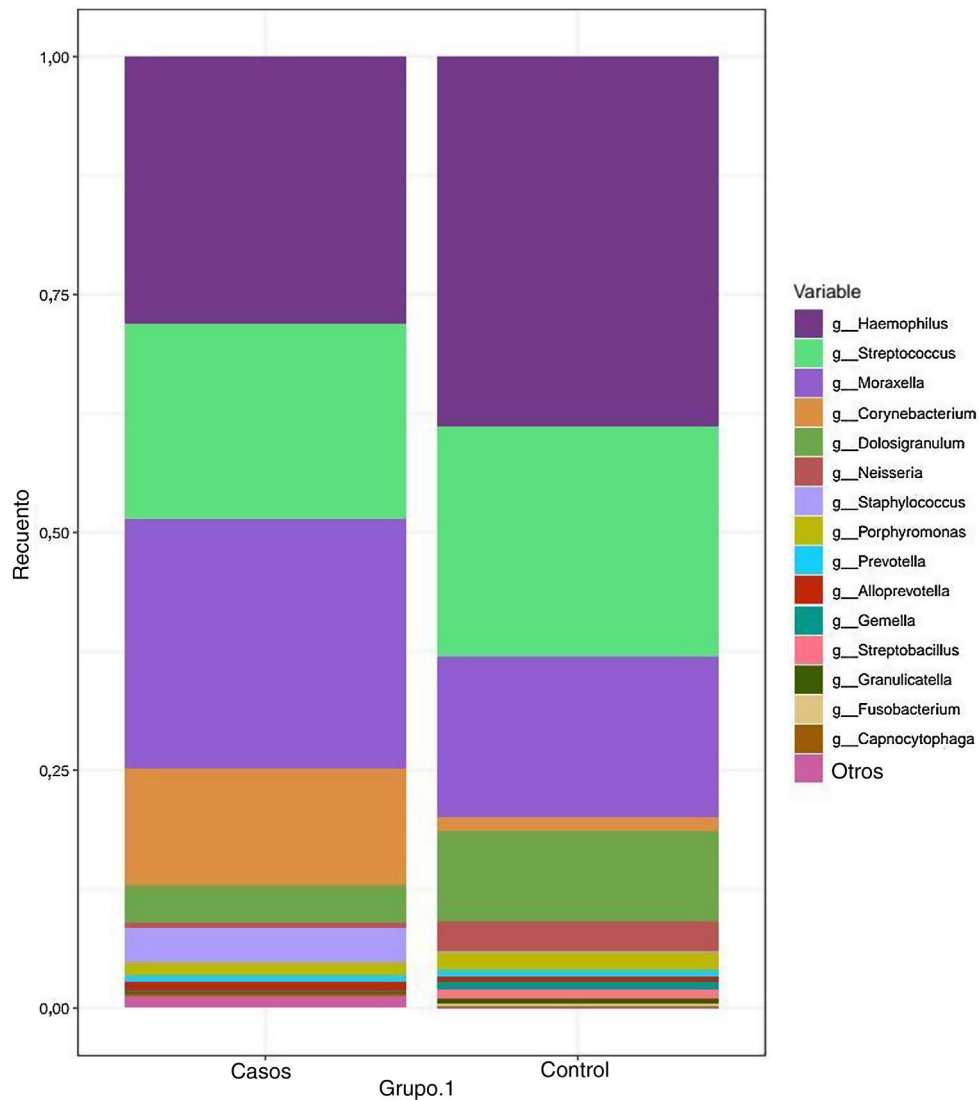
puede revelar aspectos de la ecología microbiana que pueden pasar desapercibidos mediante la mera consideración de la composición individual de las muestras. Para analizar la diversidad beta, se transformaron las unidades taxonómicas operativas (OTU, por sus siglas en inglés) en abundancias relativas, excluyéndose aquellos OTU que correspondían a abundancias relativas inferiores al 0,1%. No se observaron diferencias significativas en las matrices de distancias empleadas ( $p = 0,61$ ) (fig. 3).

### Detección de virus respiratorios

En 80% de los casos de EK ( $n = 8$ ), la prueba RT-PCR detectó la presencia de ADN/ARN de algunos de los virus respiratorios incluidos en el panel, en comparación con el 60% de los controles sanos ( $p = 0,659$ ). Los virus detectados con mayor frecuencia en el grupo de EK fueron rinovirus ( $n = 4$ ; 40%), adenovirus ( $n = 3$ ; 30%), virus respiratorio sincitial ( $n = 2$ ; 20%) y parainfluenza 4 ( $n = 1$ ; 10%), mientras que en el grupo control fueron rinovirus ( $n = 4$ ; 40%), coronavirus ( $n = 3$ ; 30%), adenovirus ( $n = 2$ ; 20%) y bocavirus ( $n = 1$ ; 10%). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (tabla 3).

### Discusión

Hasta donde conocemos, este es el primer estudio que ha encontrado diferencias en la composición del microbioma respiratorio entre pacientes con EK y controles sanos. En 2004, Horita et al. recogieron frotis nasofaríngeos en 21 pacientes con EK y 20 controles con síndrome febril no relacionado con EK. Se aislaron 61 cepas bacterianas de los pacientes con EK y 62 cepas de los controles. Los autores no encontraron diferencias entre los pacientes

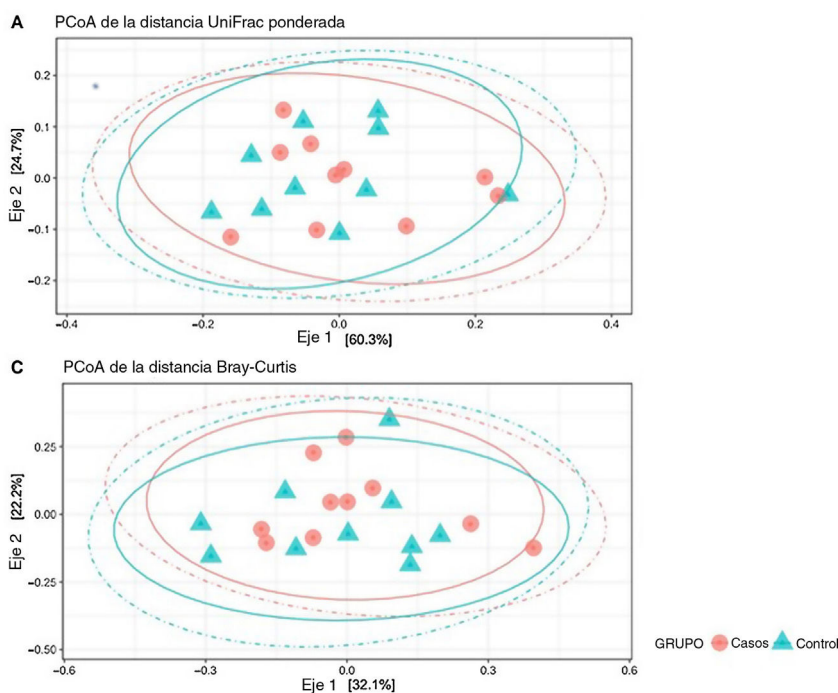


**Figura 2** Composición taxonómica bacteriana de las muestras nasofaríngeas en los grupos de casos y de control: diagrama de barras apiladas que muestra la abundancia relativa (promedio) de los géneros bacterianos detectados con mayor frecuencia en cada grupo. Los géneros con un promedio de abundancia relativa inferior al 0,5% se incluyeron en la categoría «otros géneros».

**Tabla 2** Abundancias relativas de los géneros detectados con mayor frecuencia en casos y controles

Género	Casos	Controles	P (Bonferroni-Holm)
Haemophilus	27,98 ± 34,28	38,83 ± 36,60	0,696
Streptococcus	20,62 ± 21,83	24,21 ± 27,79	1,223
Moraxella	26,20 ± 33,99	16,79 ± 23,49	0,607
Corynebacterium	12,25 ± 22,11	1,59 ± 4,63	0,045
Dolosigranulum	3,91 ± 6,46	9,40 ± 26,27	0,606
Neisseria	0,604 ± 1,44	3,22 ± 8,77	0,621
Staphylococcus	3,59 ± 7,48	0,08 ± 29,05	0,727
Gemella	0,17 ± 0,18	0,88 ± 0,12	-
Streptobacillus	0,006 ± 0,012	0,95 ± 2,75	-
Granulicatella	0,12 ± 0,28	0,56 ± 1,32	-
Otros	1,34 ± 2,48	0,17 ± 0,33	-

Datos expresados como media ± desviación estándar.



**Figura 3** Diversidad beta: las unidades taxonómicas operativas (OTU) son grupos (clústeres) de variantes secuencia del gen ARNr 16S. Cada clúster supuestamente representa una unidad taxonómica de especies, géneros, grupos o taxones. Dependiendo del umbral de identidad entre las secuencias de un clúster, cabe suponer que la OTU corresponde a una especie o género específico. Las OTU con una identidad del 97% corresponden a géneros bacterianos. Las OTU se clasificaron en distintos rangos taxonómicos (dominio, división, orden, familia y género) con un umbral inferior de confianza de 80%. Las OTU se transformaron a abundancias relativas, excluyéndose aquellas correspondientes a una abundancia relativa inferior a 0,1%. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las matrices de distancia empleadas ( $p = 0,61$ ).

**Tabla 3** Frecuencia de infección viral de vías respiratorias y distribución individual de virus analizada mediante RT-PCR en casos y controles

	Casos (n = 10)	Controles (n = 10)	p (Fisher)
Infección de vías respiratorias	8 (80%)	6 (60%)	0,659
Virus respiratorio sincitial	2 (20%)	–	0,476
Parainfluenza 4	1 (10%)	–	1,000
Adenovirus	3 (30%)	2 (20%)	1,000
Coronavirus	1 (10%)	3 (30%)	0,586
Bocavirus	–	1 (10%)	1,000
Rinovirus	4 (40%)	4 (40%)	1,000
Coinfección viral de vías respiratorias (> 1 virus)	3 (30%)	3 (30%)	1,000

con EK y los controles febriles en las especies bacterianas presentes en la flora nasofaríngea<sup>13</sup>.

En nuestro estudio, se tomaron muestras de aspirado nasofaríngeo de 10 pacientes con EK y 10 controles sanos y se estudió el microbioma por medio de NGS. Se observó una diferencia en la proporción de *Corynebacterium*, que estaba sobrerrepresentado en el grupo con EK (12,25% vs. 1,59%;  $p = 0,045$ ). Además, la proporción de otros géneros con abundancias inferiores al 0,5% también fue mayor en el grupo de casos en comparación con el de control (16,07% vs. 7,82%;  $p = 0,08$ ). Un estudio previo cuyo objeto era aislar el gen bacteriano del agente causativo de leucocitos periféricos en pacientes con EK identificó una nueva especie del género *Corynebacterium*<sup>27</sup>. También se identificaron

*Corynebacterium* spp. en muestras de aerosoles recogidas al nivel del suelo cerca de Tokio en un momento en que la incidencia de EK era alta. Curiosamente, un número importante de taxones adicionales previamente asociados a la EK en distintos estudios también han sido identificados en el análisis metagenómico de muestras de aire. Esto sugiere que la exposición a aire con diferentes cargas bacterianas podría contribuir a la patogénesis de la EK, un aspecto que merece estudiarse con más detalle<sup>24,25,28</sup>.

El género *Corynebacterium* es un taxón de bacilos o cocabacilos grampositivos de morfología corineforme<sup>29,30</sup>. Casi todos son catalasa positivos y expresan un amplio abanico de pigmentos y procesos metabólicos. Las bacterias de este género son ubicuas y se encuentran comúnmente en la piel



y mucosas de los seres humanos, y casi todas son saprofitas. Distintas especies de *Corynebacterium* se han identificado en el oído medio de niños con otitis media, pudiendo causar infecciones oportunistas, y algunas especies, como *Corynebacterium diphtheriae*, son patogénicas para los seres humanos<sup>31</sup>.

Otros estudios del microbioma intestinal han observado que el género beneficioso *Lactobacillus* puede estar ausente o desaparecer de la flora enteral durante la fase aguda de la EK<sup>14</sup> y que parece haber un aumento relativo del género *Streptococcus* en la fase aguda de la enfermedad y del *Ruminococcus* en la fase subaguda<sup>15</sup>. En nuestro estudio, no encontramos diferencias en ninguno de estos 3 géneros en las muestras, lo que podría deberse al reducido tamaño muestral o al hecho de que se estudiaron muestras respiratorias en lugar de fecales.

La contribución de los virus a la EK viene sugerida por estudios que han encontrado cuerpos de inclusión citoplasmáticos que contenían ARN viral en el epitelio bronquial de pacientes con EK fallecidos<sup>19</sup>. Aunque varios estudios han intentado identificar el origen de este ARN viral, no se ha identificado ningún virus, y Rowley et al. concluyeron que podría ser un virus ARN ubicuo aún por identificar que podría producir una infección persistente del epitelio bronquial, contribuyendo así a la etiología de la EK<sup>18,20</sup>. En otro estudio, Turnier et al. encontraron que casi la mitad (n = 93; 41,9%) de los 192 pacientes con EK en estudio tenían una prueba PCR de detección de virus respiratorios positiva, principalmente para rinovirus o enterovirus<sup>21</sup>. De manera similar, en nuestro estudio no se encontraron diferencias entre casos y controles, aunque rinovirus y adenovirus, entre otros, fueron identificados en casi la mitad de las muestras en ambos grupos.

Aunque nuestro estudio adolece de algunas limitaciones obvias, principalmente el pequeño tamaño muestral y la falta de comparación, no solo con controles sanos, sino también con niños con enfermedades respiratorias, los resultados resultan intrigantes si se contempla la posibilidad de una etiología única para esta enfermedad.

No obstante, es posible que la EK sea una enfermedad multifactorial y que la exposición a una variedad de agentes microbianos o la dominancia de agentes microbianos con similitudes estructurales provoquen la misma respuesta inmunitaria idiosincrática. Hay un nivel de evidencia razonable de que un desequilibrio en el microbioma contribuye a la patogénesis de la EK. Nuestro estudio presenta el género *Corynebacterium* como un nuevo agente que podría estar en juego y demuestra la necesidad de realizar estudios epidemiológicos a mayor escala para revelar cambios en el microbioma de los pacientes con EK.

El presente artículo no establece una relación causal, pero sienta las bases para realizar estudios en muestras mayores que contribuyan a esclarecer el papel del género *Corynebacterium* en la patogénesis de EK. Nuestro grupo ya está recogiendo más muestras de pacientes con EK, controles sanos y pacientes con infecciones respiratorias para intentar obtener resultados más concluyentes.

## Conclusión

Hasta donde conocemos, este es el primer estudio que ha encontrado diferencias en la composición del microbioma

respiratorio entre pacientes con EK y controles sanos. El género *Corynebacterium* presentó una mayor abundancia en el grupo de EK en comparación con el grupo control. Nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de que puede haber un sustrato microbiano respiratorio facilitador del desarrollo de enfermedad en pacientes con predisposición genética. Son necesarios estudios en muestras mayores para evaluar su relevancia y su posible asociación con la EK.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Estatal de I+D+i, Instituto de Salud Carlos III (expediente PI20/00517) y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Parte de la financiación provino de una beca de la Sociedad Española de Reumatología Pediátrica (SERPE) (2018) y una beca de la Fundació Daniel Bravo Andreu (2016) otorgada al proyecto WINDBIOME. Estas instituciones no se involucraron en el diseño del estudio, la recogida de datos, la decisión de publicar o la redacción del manuscrito.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se llevó a cabo en ausencia de relaciones de naturaleza comercial o financiera que pudiesen constituir un conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Agradecemos el apoyo recibido del Ministerio de Ciencia e Innovación de España a través del programa de Apoyo a Centros de Excelencia Severo Ochoa 2019-2023 (CEX2018 000806S) y de la Generalitat de Catalunya a través de la Institució CERCA.

## Bibliografía

1. McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, Burns JC, Bolger AF, Gewitz M, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: A scientific statement for health professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135:e927-99, <http://dx.doi.org/10.1161/CIR.0000000000000484>.
2. Lou J, Zhong R, Shen N, Lu X, Ke J, Duan J, et al. Systematic confirmation study of GWAS-identified genetic variants for Kawasaki disease in a Chinese population. *Sci Rep*. 2015;5:8194, <http://dx.doi.org/10.1038/srep08194>.
3. Burgner D, Davila S, Breunis WB, Ng SB, Li Y, Bonnard C, et al. A genome-wide association study identifies novel and functionally related susceptibility Loci for Kawasaki disease. *PLoS Genet*. 2009;5:e1000319, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000319>.
4. Tsai F-J, Lee Y-C, Chang J-S, Huang L-M, Huang F-Y, Chiu N-C, et al. Identification of novel susceptibility Loci for kawasaki disease in a Han chinese population by a genome-wide association study. *PLoS One*. 2011;6:e16853, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016853>.
5. Lederberg BJ, McCray AT. "Ome Sweet" Omics 3A genealogical treasury of words. *Sci*. 2001;15:8.
6. Vieira S, Pagovich O, Krieger MA. Diet, microbiota and autoimmune diseases. *Lupus*. 2014;23:518-26, <http://dx.doi.org/10.1177/096120313501401>.

7. Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van Der Woude D, et al. Antibodies to Porphyromonas encialis are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *J Rheumatol*. 2010;37:1105–12, <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.091323>.
8. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, et al. Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*. 2013;2:e01202, <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.01202.001>.
9. Hevia A, Milani C, López P, Cuervo A, Arbolea S, Duranti S, et al. Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. *MBio*. 2014;5:e01548, <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01548-14>.
10. Rosenbaum JT, Silverman GJ. The microbiome and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2018;378:2236–7, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMcibr1804368>.
11. Toubiana J, Poirault C, Corsia A, Bajolle F, Fourgeaud J, Angoulvant F, et al. Kawasaki-like multisystem inflammatory syndrome in children during the covid-19 pandemic in Paris. France: prospective observational study. *BMJ*. 2020;369:m2094, <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.m2094>.
12. Verdoni L, Mazza A, Gervasoni A, Martelli L, Ruggeri M, Ciuffreda M, et al. An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: An observational cohort study. *Lancet*. 2020;395:1771–8, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31103-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31103-X).
13. Horita N, Yokota SI, Fuse S, Takamuro M, Tomita H, Sato K, et al. The throat flora and its mitogenic activity in patients with Kawasaki disease. *Microbiol Immunol*. 2004;48:899–903, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03609.x>.
14. Takeshita S, Kobayashi I, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I. Characteristic profile of intestinal microflora in Kawasaki disease. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2002;91:783–8, <http://dx.doi.org/10.1080/08035250213221>.
15. Kinumaki A, Sekizuka T, Hamada H, Kato K, Yamashita A, Kuroda M. Characterization of the gut microbiota of Kawasaki disease patients by metagenomic analysis. *Front Microbiol*. 2015;6:B24, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00824>.
16. Esposito S, Polinori I, Rigante D. The gut microbiota-host partnership as a potential driver of Kawasaki syndrome. *Front Pediatr*. 2019;7:124, <http://dx.doi.org/10.3389/fped.2019.00124>.
17. Kaneko K, Akagawa S, Akagawa Y, Kimata T, Tsuji S. Our evolving understanding of Kawasaki disease pathogenesis: Role of the gut microbiota. *Front Immunol*. 2020;11:1616, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.01616>.
18. Rowley AH, Baker SC, Shulman ST, Rand KH, Tretiakova MS, Perlman EJ, et al. Ultrastructural immunofluorescence, and rna evidence support the hypothesis of a “new” virus associated with Kawasaki disease. *J Infect Dis*. 2011;203:1021–30, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq136>.
19. Rowley AH, Baker SC, Shulman ST, Fox LM, Takahashi K, Garcia FL, et al. Cytoplasmic inclusion bodies are detected by synthetic antibody in ciliated bronchial epithelium during acute Kawasaki disease. *J Infect Dis*. 2005;192:1757–66, <http://dx.doi.org/10.1086/497171>.
20. Rowley AH, Baker SC, Orenstein JM, Shulman ST. Searching for the cause of Kawasaki disease —cytoplasmic inclusion bodies provide new insight. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:394–401, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1853>.
21. Turnier JL, Anderson MS, Heizer HR, Jone PN, Glodé MP, Dominguez SR. Concurrent respiratory viruses and Kawasaki disease. *Pediatrics*. 2015;136:e609–14, <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2015-0950>.
22. Ballester J, Borràs S, Curcoll R, Navarro-Gallinad A, Pozdniakova S, Cañas L, et al. On the interpretation of the atmospheric mechanism transporting the environmental trigger of Kawasaki disease. *PLoS One*. 2019;14:e0226402, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0226402>.
23. Manlhiot C, Mueller B, O’Shea S, Majeed H, Bernknopf B, Labelle M, et al. Environmental epidemiology of Kawasaki disease: Linking disease etiology, pathogenesis and global distribution. *PLoS One*. 2018;13:1–17, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0191087>.
24. Rodó X, Curcoll R, Robinson M, Ballester J, Burns JC, Cayan DR, et al. Tropospheric winds from northeastern China carry the etiologic agent of Kawasaki disease from its source to Japan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:7952–7, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1400380111>.
25. Rodó X, Ballester J, Cayan D, Melish ME, Nakamura Y, Uehara R, et al. Association of Kawasaki disease with tropospheric wind patterns. *Sci Rep*. 2011;1:152, <http://dx.doi.org/10.1038/srep00152>.
26. Sato W, Ishibashi KI, Yamanaka D, Adachi Y, Ohno N. Effects of natural and chemically defined nutrients on candida albicans water-soluble fraction (CAWS) vasculitis in mice. *Med Mycol J*. 2017;58:E47–52, <http://dx.doi.org/10.3314/mmj.16-00014>.
27. Shibata M, Ezaki T, Hori M, Nagashima M, Morishima T. Isolation of a Kawasaki disease —associated bacterial sequence from peripheral blood leukocytes. *Pediatr Int*. 1999;41:467–73, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1442-200x.1999.01115.x>.
28. Burns JC, Herzog L, Fabri O, Tremoulet AH, Rodó X, Uehara R, et al. Seasonality of Kawasaki disease: A global perspective. *PLoS One*. 2013;8:e74529, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074529>.
29. Tauch A, Fernández-Natal I, Soriano FA. Microbiological and clinical review on *Corynebacterium kroppenstedtii*. *Int J Infect Dis*. 2016;48:33–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.04.023>.
30. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3152–8, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00796-12>.
31. Lappan R, Jamieson SE, Peacock CS. Reviewing the pathogenic potential of the otitis-associated bacteria *alloioccocus otitidis* and *Turicella otitidis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10, <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.00051>.