



# **The Role of Respiratory Microbiota in Asthma Pathogenesis.**

**Prepared by: Nadia Al Ramahi**

**Principal supervisor: Prof. Iman Basheti**

**Co-supervisor: Dr. Mohammad Al-Najjar**

**This thesis was submitted in Partial Fulfillment of the requirements for the Master's  
degree in Pharmaceutical Science**

**Department of pharmaceutical sciences- College of Pharmacy**

**Deanship of Scientific Research and Graduate Studies**

**Applied Science University**

**Amman-Jordan**

**June 2020**

# **The Role of Respiratory Microbiota in Asthma Pathogenesis.**

**By: Nadia Al Ramahi**

**Supervisor: Prof. Iman Basheti**

**Co-supervisor: Dr. Mohammad Alnajjar**

## **Abstract**

**Background:** There has been a long-standing interest in the role of bacterial communities in the complex and heterogeneous disease of asthma. Actually, with the advent of 16s ribosomal RNA gene sequencing, a culture independent technique, a strong association between the presences of bacterial communities in the lung with asthma has emerged. It has become increasingly evident that microbial colonization in the lower respiratory tract (LRT) might have a role in the pathogenesis of asthma. As well as, identification of lower airway microbiota indicated that the lower airways harbor a community of bacterial species, which is altered in asthma. Therefore, this study was designed to identify the common microorganisms in the LRT among asthmatic and non-asthmatic subjects in Jordan. As well as to identify common microbial biomarkers, that could be used as a diagnostic tool for an early diagnosis and treatment of asthma.

**Method:** Induced sputum samples were obtained from 27 asthmatic patients and 27 non-asthmatic subjects. DNA was extracted from the induced sputum and Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of the V4 region of bacterial 16s rRNA gene was performed. Purified and pooled PCR products were sequenced. Sequenced data were processed using molecular research DNA analysis pipeline. Operational taxonomic units (OTUs) were defined by clustering at 3% divergence (97% similarity). Final OTUs were taxonomically classified using BLASTn against a curated database derived from RDPII and NCBI.

**Results:** All sputum samples contained five major bacterial phyla: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, and fusobacterium, with the first three phyla accounting for 90% of the total sequences. Proteobacteria were present in higher proportions in asthmatic patients (31% vs. 17%) (P value=0.04), with a high abundance of the potential pathogen *Haemophilus influenza* in asthmatics airways. In contrasts,

Firmicutes (36% vs. 44%) P value=0.07 and Bacteroidetes (23% vs. 28%) P value=0.054 were found more frequently in samples from non-asthmatic subjects. In addition, samples from asthmatic patients had greater bacterial diversity compared with samples from non-asthmatic subjects.

Conclusion: This study revealed that asthmatic patients have an altered microbial composition in their lower airways. As well as, sputum microbiota in asthmatic patients differed from non-asthmatic (control) subjects, and was characterized by the presence of much more *Haemophilus* spp. in asthmatic airways, particularly *Haemophilus influenzae*. Where these organisms can be a causative factor in the pathophysiology of asthma.

## دور الكائنات الحية الدقيقة في الجهاز التنفسي في التسبب في مرض الربو

دراسة : ناديا محمد الرمحي

مشرف رئيسي: أ.د. إيمان البشيتي

مشرف مشارك : د. محمد النجار

### الملخص

هناك اهتمام طويل الامد بدور المجتمعات البكتيرية في مرض الربو المعقد و غير المتجانس. في الواقع، مع ظهور تسلسل الجينات الحمض النووي الريبوسومي 16s rRNA ، ظهر ارتباط قوي بين وجود المجتمعات البكتيرية في الرئة مع مرض الربو. و قد اصبح من الواضح و بشكل متزايد ان الاستعمار الميكروبي في الجهاز التنفسي السفلي قد يكون له دور في التسبب بمرض الربو. و كذلك بيّن تحديد الكائنات الحية الدقيقة في مجرى الهواء السفلي الى ان الشعب الهوائية السفلى تؤوي مجموعة من الانواع البكتيرية التي يتم تغييرها عن الاشخاص المصابين بمرض الربو. لذلك ، تم تصميم هذه الدراسة لتحديد الكائنات الحية الدقيقة الشائعة عند مرضى الربو والاشخاص الاصحاء في الاردن. و كذلك تحديد الميكروبات الشائعة التي يمكن استخدامها كأداة تشخيصية مبكرة لتشخيص مرض الربو و علاجه.

تم الحصول على عينات البلغم من 27 مريض مصاب بالربو و 27 شخص غير مصابين بالربو (أصحاء)، و تم استخلاص الحمض النووي من

البلغم و مضاعفته بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في منطقة V4 للجين البكتيري 16s rRNA . ومن ثم تم ترتيب منتجات (PCR) المنقاة والمجمعة وتمت معالجة البيانات المتسلسلة باستخدام البحوث الجزيئية لتحليل الحمض النووي. بعد ذلك تم تعريف الوحدات التصنيفية الجزيئية (OTUs) عن طريق تجميع 97% تشابه، ومن ثم تصنيفها باستخدام BLASTn مقابل قاعدة بيانات منظمة مشتقة من RDPII و NCBI.

احتوت جميع عينات البلغم على خمسة أنواع بكتيريا رئيسية: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, and fusobacterium ، مع اول ثلاثة انواع تمثل 90% من التسلسل الكلي. Proteobacteria موجودة بنسب أعلى في مرضى الربو (31% مقابل 17%). مع وفرة عالية من *Haemophilus influenza* عند مرضى الربو. ايضا تم العثور على (36% مقابل 44%) من Firmicutes و (23% مقابل 28%) من Bacteroidetes عند الاشخاص الغير مصابين بالربو (الاصحاء). بالإضافة إلى ذلك، كان لدى عينات مرضى الربو تنوع بكتيري أكبر مقارنة بالعينات المأخوذة من الأشخاص الاصحاء غير المصابين بالربو.

وكشفت هذه الدراسة أن مرضى الربو لديهم تركيبة ميكروبية متغيرة في الشعب الهوائية السفلية و مختلفة عن الأشخاص الاصحاء غير المصابين بالربو. بالإضافة الى وفرة *Haemophilus spp* تحديدا *Haemophilus influenza* . حيث ان هناك الحاجة لمزيد من الدراسات والتحقيقات لمعرفة دور هذه الكائنات في الفيزيولوجيا المرضية لمرض الربو.

