

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Alteració microbiana en la infecció recurrent del tracte urinari en el microbioma intestinal i vaginal



Adrià Cruells Gascon
Barcelona 2025



El Dr. Ferran Navarro Risueño, la Dra. Elisenda Miró Cardona i el Dr. Joaquín López-Contreras González

Certifiquen que,

El present treball, «Alteració microbiana en la infecció recurrent del tracte urinari en el microbioma intestinal i vaginal», presentat per Adrià Cruells Gascon per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona ha sigut desenvolupat sota la seva direcció i reuneix tots els requisits necessaris per a la seva lectura i defensa davant del tribunal corresponent.

Per a que així consti;

firmem aquest certificat a Barcelona, el 10 de febrer del 2025.

**FERRAN
NAVARRO
RISUEÑO -
DNI
38558243P**

Firmado digitalmente por
FERRAN NAVARRO RISUEÑO
- DNI 38558243P
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES, sn=NAVARRO
RISUEÑO,
givenName=FERRAN,
serialNumber=IDCES-385582
43P, cn=FERRAN NAVARRO
RISUEÑO - DNI 38558243P
Fecha: 2025.02.17 10:37:19
+01'00'

Dr. Ferran Navarro Risueño

Signat
digitalment per
ELISENDA MIRO
Data: 2025.02.17
11:20:42 +01'00'
Versió d'Adobe
Acrobat Reader:
2019.008.20071

Dra. Elisenda Miró Cardona

**JOAQUIN
LOPEZ-
CONTRERAS
GONZALEZ /
num:08260514**

Firmado digitalmente
por JOAQUIN LOPEZ-
CONTRERAS
GONZALEZ /
num:08260514
Fecha: 2025.02.17
11:24:48 +01'00'

Dr. Joaquín López-Contreras



Departament de Genètica i de Microbiologia

Programa de Doctorat en Microbiologia

Universitat Autònoma de Barcelona



SANT PAU
Campus Salut
Barcelona



Hospital de
la Santa Creu i
Sant Pau

TESI DOCTORAL

Alteració microbiana en la infecció recurrent del tracte urinari en el microbioma intestinal i vaginal

Presentada per: Adrià Cruells Gascon

Per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de
Barcelona

Dirigida pel Dr. Ferran Navarro Risueño, la Dra. Elisenda
Miró Cardona i el Dr. Joaquín López-Contreras González

Tutoritzada pel Dr. Ferran Navarro Risueño

Barcelona 2025

Agraïments

En primer lloc, m'agradaria expressar el meu agraïment als directors de la tesi, el Dr. Navarro, la Dra. Miró i el Dr. López-Contreras per la dedicació i paciència que han tingut amb mi durant aquests anys.

El Dr. Navarro m'ha acollit i orientat durant tots aquests anys d'aprenentatge formant-me en aspectes tant assistencials com de recerca. La Dra. Miró ha estat sempre al meu costat recolzant-me en tots els aspectes de la recerca i introduint-me en aquest món, i finalment el Dr. López-Contreras m'ha ajudat i orientat en tots els aspectes clínics de la tesi.

Agraeixo al Dr. López-Contreras, al Dr. Errando-Smet, a la Dra. Mateu i al Dr. Alonso-Tarrés de la Fundació Puigverd, juntament amb la Dra. Vanrell i la Dra. Luqui del Servei de Ginecologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau la seva dedicació, el reclutament de les pacients i l'obtenció de les mostres.

Moltes gràcies al Dr. Paytuví-Gallart i al Dr. Sanseverino pel seu ajut en l'anàlisi bioinformàtica. N'he après molt al vostre costat i ara tinc una millor visió del món del microbioma i de com analitzar-lo gràcies a vosaltres.

Voldria fer un agraïment especial al Dr. Rubio, en Marc, un company amb qui compartir no només resultats (i algú que m'entengués quan parlava d'ordinadors), sinó també un amic.

M'agradaria també mostrar el meu agraïment a tot el Servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau per haver estat al meu costat i ensenyar-me com treballar en el laboratori. Especialment, voldria agrair a la Laura Gómez i a la Montse Español tots els aprenentatges rebuts i les hores compartint laboratori.

A tots els amics que han estat allà, però en concret alguns que han aguantat moltes converses sobre articles, com el David o l'Eric, que han sigut amics que, sense saber-ho, m'han ajudat molt en els moments més durs.

Gràcies als meus pares, la Pili i el Lamberto, i el meu germà, Ferran per ser allà i, tot i que no paren de preguntar què és el que faig i després d'explicar-los molts

cops que «faig coses de microorganismes», sempre m'han recolzat en aquest camí, tot i que entretingut, difícil.

Parlant dels de casa, gràcies *Hatiño*, *Timonchin* o *Lilusqui* per fer-me companyia a cada paraula de la tesi, essent al meu costat o a vegades en front de la pantalla i fent que repeteixi algun que altre paràgraf.

Per últim, la persona que més ha sofert amb la tesi després de mi. «*Ya la entrego, prometo que no se alarga más, que la deposito y podemos hacer otras cosas*». Raquel, gràcies per tot, m'has ajudat molt amb la tesi, i potser sense la teva fortalesa, no tinc clar que això estigués escrit ara mateix.

Índex

Abreviatures	3
1 Introducció	4
1.1 Infeccions urinàries	4
1.1.1 Infecció del tracte urinari	4
1.1.2 Infecció del tracte urinari de repetició	6
1.1.3 Diagnòstic de les infeccions del tracte urinari	7
1.1.4 Tractament	8
1.2 El microbioma	9
1.2.1 Microbiota	10
1.2.2 Bioma	12
1.3 Interaccions del microbioma	12
1.3.1 Interaccions dels microorganismes amb el bioma	12
1.3.2 Interaccions entre els microorganismes	13
1.4 Mètodes d'estudi de la microbiota i el microbioma	14
1.5 Microbioma humà	16
1.5.1 Microbioma urinari	18
1.5.2 Microbioma vaginal	19
1.5.3 Microbioma intestinal	20
1.6 El microbioma humà en la malaltia	21
1.6.1 El microbioma humà en la malaltia urinària	22
1.7 Viroma	23
2 Hipòtesis	25
3 Objectius	25
3.1 Objectiu principal:	25
3.2 Objectius secundaris:	25
4 Material i mètodes	26
4.1 Població d'estudi	26
4.1.1 Criteris d'exclusió de l'estudi:	26
4.1.2 Anàlisi estadística de la població estudiada	27
4.2 Estudi d'infecció d'orina	28
4.3 Recollida i extracció del material genètic	28
4.3.1 Mostres vaginals	28
4.3.2 Mostres fecals	28
4.4 Seqüenciació	29

4.4.1	Control de qualitat	29
4.4.2	Preparació de llibreries	29
4.4.3	Seqüenciació	29
4.5	Anàlisi bioinformàtica	30
4.5.1	Preparació dels <i>reads</i> de la seqüenciació	30
4.5.2	Classificació taxonòmica dels regnes Bacteria, Eukarya i Arquea	30
4.5.3	Taxonomia de virus bacterians (fags)	31
4.5.4	Assignació de funcions al microbioma	31
4.6	Anàlisi estadística dels resultats	31
4.6.1	Estudi de la composició	32
4.6.2	Diversitat alfa	32
4.6.3	Diversitat beta	33
4.6.4	Anàlisi diferencial	33
4.6.5	Estudi de biomarcadors	34
4.6.7	Perfils de microbioma vaginal	34
4.6.8	Anàlisi diferencial i enriquiment	35
5	Resultats i argumentació	35
5.1	Població estudiada	35
5.1.2	Estudi d'infecció d'orina	36
5.2	Control de qualitat de l'extracció d'àcids nucleics i de la seqüenciació	37
5.3	Microbioma fecal	38
5.3.1	Assignació d'OTU	38
5.3.2	Estudi de la composició	39
5.3.3	Diversitat alfa	40
5.3.4	Diversitat beta	41
5.3.5	Anàlisi diferencial	43
5.3.6	Anàlisi de biomarcadors	47
5.4	Microbioma vaginal	49
5.4.1	Assignació d'OTU	49
5.4.2	Anàlisi de la composició	49
5.4.3	Diversitat alfa	50
5.4.4	Diversitat beta	52
5.4.5	Anàlisi diferencial	52
5.4.6	Anàlisi de biomarcadors	58
5.5	Eix intestí-vagina	59

5.6 Efecte de les relacions postcoitals en el microbioma de dones amb ITUr	60
5.6.1 Anàlisi de la composició	60
5.6.2 Diversitat alfa.....	62
5.6.3 Diversitat beta	63
5.6.4 Anàlisi diferencial.....	64
5.6.5 Perfils vaginals	70
5.7 Efecte del sòl pelvià en el microbioma	71
5.7.1 Diversitat alfa.....	72
5.7.2 Diversitat beta	72
5.7.3 Anàlisi diferencial.....	72
5.8 El viroma en la infecció recurrent d'orina	73
5.8.1 Anàlisi diferencial.....	73
5.8.2 Correlació per hoste	75
5.9 Les funcions dels gens del microbioma en la infecció urinària recurrent.....	77
6 Conclusions.....	81
7 Bibliografia.....	82
Annex	97

Abreviatures

ITU : Infecció del tracte urinari

ITUr: Infecció del tracte urinari de repetició

dPCoA: Doble anàlisi de components coordinats principals

ITS: regió espaiadores transcrita interna

ADN: Àcid desoxiribonucleic

ARN: Àcid ribonucleic

r.p.m: Revolucions per minut

BBDD: Base de dades

IMC: Índex de massa corporal

SCFA: *Short chain fatty acids* (àcids grassos de cadena curta)

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

BAL: Bacteris de l'àcid làctic

OTU: Operational taxonomic unit

1 Introducció

1.1 Infeccions urinàries

1.1.1 Infecció del tracte urinari

Les infeccions del tracte urinari (ITU) són colonitzacions i posterior proliferacions de microorganismes que aconseguen establir-se en el tracte urinari. Aquestes proliferacions són degudes a bacteris de l'exterior de l'aparell urinari, majoritàriament de la microbiota intestinal (1). En un estat fisiològic, aquestes colonitzacions es produeixen regularment, però el flux d'orina freqüent neteja les vies i evita les possibles proliferacions (figura 1). Els microorganismes que causen una ITU a la bufeta aconseguen pujar a través dels urèters fins arribar al ronyó, on poden arribar a produir sèpsia (1). Les ITU son especialment comunes en dones (2), el 50 % de les quals es preveu que n'experimentin almenys un episodi en la vida. En un estudi de 2013 en els Estats Units, les ITU van representar 10,5 milions de visites l'any (3). A Itàlia el 2014, *Ciani et al.*, van estimar que el cost de cada ITU era aproximadament de 142 € per episodi (4).

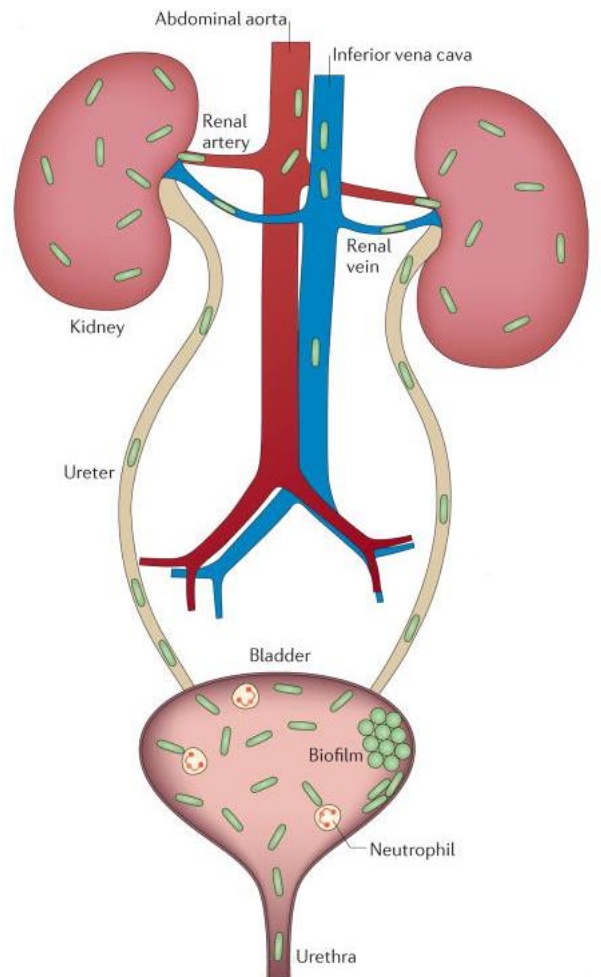


Figura 1: Representació de l'aparell urinari. S'hi observen totes les regions on es poden establir els bacteris i el camí que segueixen fins arribar a l'aparell circulatori. (Imatge adapta de Flores-Mireles et al., 2015)(1)

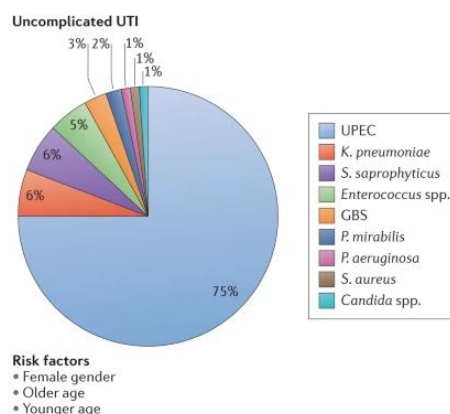


Figura 2: Patògens més detectats en les infeccions urinàries (ITU) no complicades. UPEC: Escherichia coli Uropatògena; GBS: Estreptococs del grup B (Flores-Mireles et al., 2015)(1)

L'agent causal de les ITU en un gran nombre dels episodis prové dels microorganismes de l'intestí, i el principal microorganisme és *Escherichia coli*, responsable del 80 % de les ITU no complicades en dones. Els altres

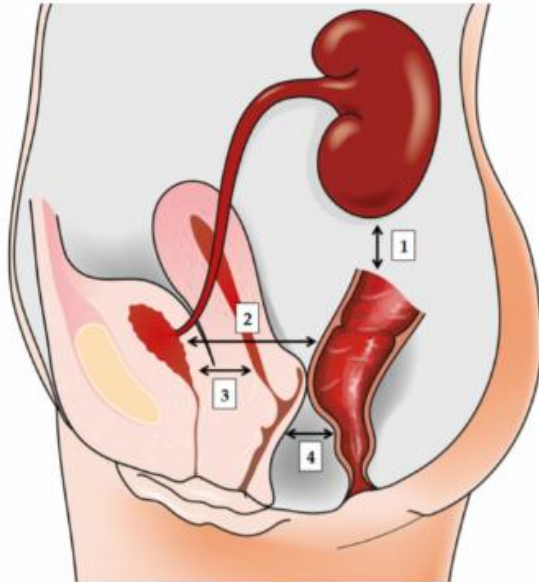


Figura 3: Representació de l'aparell urinari de la dona. S'hi observen les diferents interaccions de l'aparell urinari, la interacció de l'eix ronyó-intestí (1), la interacció de la uretra amb l'intestí (2) i la vagina (3), i per últim la connexió del final de l'intestí amb la vagina (4) (Meštrović et al., 2020)(8).

microorganismes més freqüents d'ITU també tenen el reservori a l'intestí humà. Els principals pertanyen als gèneres *Klebsiella*, *Enterococcus* i *Proteus* entre d'altres (figura 2) (1,5). Hi ha una gran diferència d'incidència entre dones (el 50 % patirà una ITU al llarg de la seva vida) i homes (en absència de factors predisponents, un 5 % patirà una ITU [6]). Aquesta diferència entre sexes es deu principalment a la diferència en la distància entre l'entrada de l'anus i la uretra, i en la longitud d'aquesta entre els dos sexes. A la figura 3 s'observa l'aparell urinari i el final de l'aparell digestiu en les dones. Si hi observem el número 4, veurem aquesta reduïda distància causant d'aquesta diferència en el nombre d'infeccions entre ambdós sexes (7,8).

En la gran majoria de les ITU de vies baixes no complicades en dones, els símptomes revelen una cistitis (pol·laciúria, disúria, tenesme...). També hi ha un percentatge no menyspreable d'episodis en els quals la infecció arriba a les vies altes i cursa amb símptomes com ara dolor lumbar, dolor en orinar, malestar general, febre i calfreds.

Les ITU suposen un gran cost econòmic a la sanitat. En un estudi als Estats Units es va determinar que els costos directes (com poden ser els professionals sanitaris, proves diagnòstiques, ingressos, antibiòtics...) i els costos indirectes

(com poden ser dies de baixa laboral) van suposar una despesa de 1600 milions de dòlars el 1995 (9). En el mateix article, els autors descriuen que el 2014 el cost associat a aquestes malalties havia ascendit a 2800 milions. Aquest fet es va replicar en l'estudi de *Foxman et al.* el 2013, en què van determinar un cost de 2900 milions de dòlars associats a les ITU, també als Estats Units d'Amèrica (1,3).

1.1.2 Infecció del tracte urinari de repetició

Es considera infecció recurrent del tracte urinari (ITUr) quan la pacient pateix dos o més episodis d'ITU en sis mesos, o tres o més episodis d'ITU en un any. Entre un 20 % i un 30 % de les dones que han patit o pateixen un episodi d'ITU presentaran ITUr. Hi ha diversos factors de risc de presentar ITUr després d'una ITU (10,11):

- Anatòmics:
 - Dificultat per buidar la bufeta.
 - Poc flux que netegi el conducte uretral.
- Conductuals
 - L'activitat sexual.
 - El tipus d'anticonceptiu, que permeti l'entrada de microorganismes de l'exterior.
 - Alguns mètodes per cohibir l'hemorràgia durant la menstruació que permetin l'entrada de microorganismes.
- Associats a l'edat
 - Dèficit d'estrògens.
 - Trobar-se en estat de menopausa.
 - L'edat, per si mateixa.
- Altres malalties no relacionades amb el tracte urinari, com poden ser la diabetis, estats d'immunodepressió...

Les ITUr suposen un problema de salut pública degut a la dificultat de diagnòstic i tractament. En la gran majoria dels casos, el patògen que produeix la infecció és el mateix de l'episodi anterior, provinent de l'intestí, que s'ha tractat en el tracte urinari però es capaç de tornar a colonitzar-lo i proliferar (1,12). Aquest fet provoca que en cada recidiva es necessitin antibiòtics de més ampli espectre,

atès que els microorganismes desenvolupen més resistències i fan més difícil la seva eliminació. En el maneig actual d'aquestes pacients s'utilitzen diverses recomanacions que han demostrat que redueixen el risc d'una nova ITU (10):

- Profilaxis amb antibiòtics després de les relacions sexuals per evitar la infecció.
- Administració de preparats concentrats de nabius, que contenen proantocianidines que disminueixen el risc d'infeccions mitjançant el bloqueig dels receptors d'unió amb les fimbries dels uropatògens.
- Administració d'estrògens local en la zona genital, especialment recomanat per a dones en edat postmenopàusica per mantenir les poblacions de *Lactobacillus*.
- Ingesta abundant d'aigua per augmentar la diüresi.

1.1.3 Diagnòstic de les infeccions del tracte urinari

El diagnòstic d'ITU es pot realitzar mitjançant l'estudi d'una tira reactiva d'orina en centres sanitaris sense laboratori, o del sediment d'orina i el posterior cultiu bacteriològic en el laboratori de microbiologia. Aquesta darrera és la tècnica de referència per a l'estudi de les ITU. Amb la tira reactiva es determina la presència de nitrits (generats pels principals uropatògens), d'esterasa leucocitària (que revela la presència de leucòcits a l'orina) i d'hemoglobina (que permet valorar la presència de microhematúria

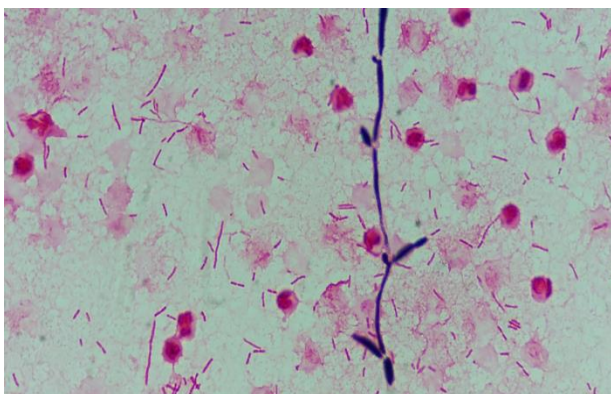


Figura 4: Tinció de Gram en el qual s'observen més de 10 cèl·lules blanques (Vermell), bacils gram negatius (rosa) i llevats (Negre). (Imatge de: <https://laboatlas.com/microbiologia/orinas-2/>)

associada). L'estudi del sediment d'orina es realitza mitjançant la sedimentació de tots els elements de l'orina i l'observació de la mostra al microscopi. Per al diagnòstic d'ITU, s'ha d'observar al microscopi un nombre elevat de leucòcits (més de 10 per camp) i una població d'un únic microorganisme. Amb el microscopi, quantifiquem els següents elements: cèl·lules de l'epiteli escamós (l'observació d'un gran nombre de cèl·lules de l'epiteli indica una mala recollida

de mostra), eritròcits i leucòcits. S'ha observat que les mostres amb una piúria elevada, més de 5-10 leucòcits per camp, permeten emetre ràpidament en dones el diagnòstic d'ITU. A més de l'observació en fresc, es pot emetre un diagnòstic més orientatiu mitjançant una tinció de Gram, que permet determinar si hi ha algun grup de microorganismes específic segons la seva morfologia i la seva coloració (figura 4) (13).

El diagnòstic de la pacient d'ITUr es més complex. L'estudi d'un possible diagnòstic d'ITUr es realitza després de la detecció del segon episodi d'ITU en una pacient en un any. La confirmació del diagnòstic del segon episodi d'ITU s'haurà de fer amb la tècnica de referència (observació al microscopi i cultiu) i amb un marge de més de dues setmanes des de la resolució de l'episodi anterior per evitar l'error d'aïllar el patogen ja tractat i en procés d'eliminació (5,10).

1.1.4 Tractament

Actualment, l'única estratègia usada en la clínica per tractar les infeccions urinàries simptomàtiques son els antibiòtics. En la majoria dels casos, s'inicia el tractament amb antibiòtics d'ampli espectre i no dirigits, és a dir, de manera empírica sense la identificació prèvia del patogen ni l'antibiograma corresponent, sinó a partir de les dades epidemiològiques. Aquesta pràctica, encara que efectiva en ocasions, comporta una sèrie de problemes significatius en l'actualitat. Un dels problemes principals és que, en alguns casos, aquest tipus de tractament no és eficaç contra el patogen responsable de la infecció. Això es tradueix en un prolongament del malestar del pacient i un increment en el temps necessari per a la recuperació, la qual cosa afecta negativament la qualitat de vida de la persona afectada (7).

A més, hi ha un segon problema d'importància creixent relacionat amb l'ús indiscriminat o excessiu dels antibiòtics. L'administració d'antibiòtics de manera generalitzada, sense una selecció acurada i personalitzada, pot contribuir a l'agreujament de les resistències antimicrobianes que alguns experts han anomenat la «pandèmia silenciosa». Aquesta situació es produeix quan els patògens, exposats repetidament als antibiòtics, desenvolupen mecanismes de resistència que els permeten sobreviure i proliferar tot i els tractaments que històricament havien estat eficaços. Això significa que, amb el temps, els

antibiòtics esdevenen cada cop menys efectius, amb la qual cosa es redueixen les opcions terapèutiques per tractar infeccions que abans es resolien fàcilment. Aquesta crisi global de resistència als antibiòtics no només complica la gestió de les infeccions urinàries, sinó que també representa un risc greu per a la salut pública, ja que cada cop són més freqüents les infeccions que no responen als tractaments convencionals (14).

A més de l'antibioteràpia, en els darrers anys s'han explorat altres estratègies alternatives dirigides més a la prevenció de les infeccions urinàries, amb l'objectiu de reduir la dependència del consum d'antibiòtics i reduir al mínim el risc d'aparició de resistències. Entre aquestes teràpies, s'ha investigat l'ús de probiòtics tant d'us oral com vaginal, especialment els que contenen soques de *Lactobacillus*, ja que ajuden a restaurar el conjunt de microorganismes de l'ambient vaginal i intestinal. En estudis recents, s'ha vist que aquests probiòtics redueixen el creixement d'uropatògens com *Escherichia coli* (15). Un altre tractament prometedor és l'ús de D-manosa o compostos rics en proantocianidines (com els nabius), que impedeixen l'adhesió dels uropatògens a les parets de la bufeta, la qual cosa facilita la seva eliminació a través de l'orina (16,17). També s'estan desenvolupant vacunes específiques contra els microorganismes causants de les infeccions urinàries que podrien ajudar a prevenir futures infeccions en persones amb recurrències freqüents (18).

1.2 El microbioma

L'estudi del microbioma es remunta a principis del segle XX, quan es feia servir el terme «flora microbiana», encunyat per Elie Metchnikov, el primer estudiant d'aquests microorganismes (19). La idea d'analitzar aquesta «flora» que prové de la microbiologia ambiental consisteix a caracteritzar les comunitats microbianes que es troben en un ambient, juntament amb les propietats fisicoquímiques d'aquest. Més endavant, amb l'inici de l'ús d'aquests estudis en el context de la salut, es va començar a estudiar aquesta flora en l'ésser humà. Juntament amb l'augment del nombre d'estudis del microbioma, es va abandonar el terme flora, més adient a la diversitat de plantes que hi ha en un medi ambient, i es va començar a parlar de microbioma. El concepte microbioma es pot dividir segons els seus components principals (20).

1.2.1 Microbiota

Actualment, la microbiota és el conjunt de microorganismes que trobem en un microbioma, siguin estables o no. Els éssers vius es classifiquen en diferents dominis, determinats per Carl Woese el 1977: el domini Bacteria, el domini Arqueobacteris, que el 2004 va passar a anomenar-se Arqueus, i el domini Eukarya (21,22):

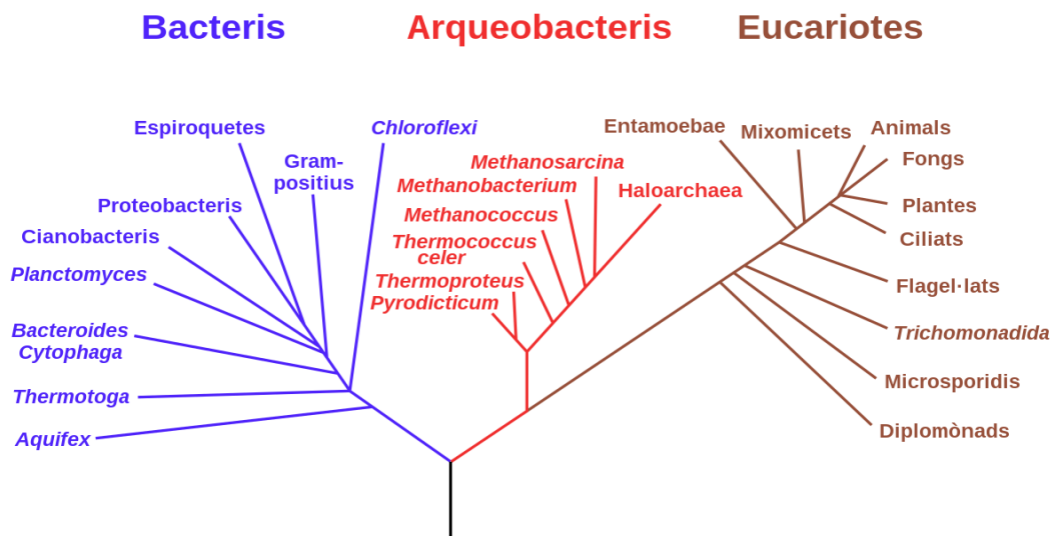


Figura 5: Classificació que Carl Woese va descriure el 1977, amb els seus 3 dominis i alguns dels grups més representatius de cada domini. Més endavant, es va determinar que la branca dels arqueobacteris no compartien tantes característiques del domini Bacteria i es van classificar com a domini Arqueu (imatge adaptada de https://ca.wikipedia.org/wiki/Carl_Richard_Woese).

- El domini Bacteria està compost per tots els bacteris. Tots comparteixen que les subunitats dels seus ribosomes són les més petites dels tres dominis, són unicel·lulars i no tenen nucli. A més a més, la gran majoria dels bacteris, com per exemple els bacteris termòfils com *Thermotoga* o els proteobacteris com *Enterobacteriaceae*, tenen una paret que els protegeix formada principalment, tot i que la seva composició pot variar, per peptidoglucans (23).
- El domini Arqueus és semblant al domini Bacteria (per exemple, molts tenen una paret), però també té semblances amb el domini Eukarya, com poden ser un material genètic envoltat per una membrana, la incapacitat de generar espores, o la presència d'un èster lipídic a la seva membrana cel·lular més semblant a la del domini Eukarya. La gran majoria es detecten en medis ambients amb condicions extremes, però també

podem trobar alguns Arqueus a l'intestí i la pell dels peixos entre d'altres (23).

- El domini Eukarya és un regne que té una alta diversitat. Es troba dividit en regnes, on es troben el regne Animalia, el regne Plantae (on trobem tant animals i plantes grans com fongs i algues microscòpiques) i el regne Protista, que inclou els excavats, les amebes, els rizaris, els heterocontes i el alveolats. Tots aquests microorganismes són microscòpics i es poden trobar tant a la natura com en simbiosi amb animals superiors. Aquest domini es caracteritza per la pèrdua de paret en molts dels seus regnes o pel manteniment d'una estructura senzilla en el regne Plantae o en els rizaris. També tenen el material genètic envoltat, i dintre del citoplasma cel·lular trobem estructures especialitzades, organel·les, que tenen funcions concretes. Els seus ribosomes tenen unes subunitats més grans i les seves parets tenen algun tipus d'èster, com ara la paret dels fongs, que conté ergosterol (23).

Fora de la classificació per dominis de Woese, es troben els virus. Encara que no estan classificats com a éssers vius, formen una part important del microbioma, ja que regulen les diverses comunitats de microorganismes. Es classifiquen principalment pel tipus de material genètic, si tenen membrana lipídica i la morfologia de la seva càpsida, que és la coberta de proteïnes que protegeix el material genètic del virus (24).

Aquests microorganismes es classifiquen en diferents agrupacions, amb nivells dintre de cada agrupació segons les diferents característiques.

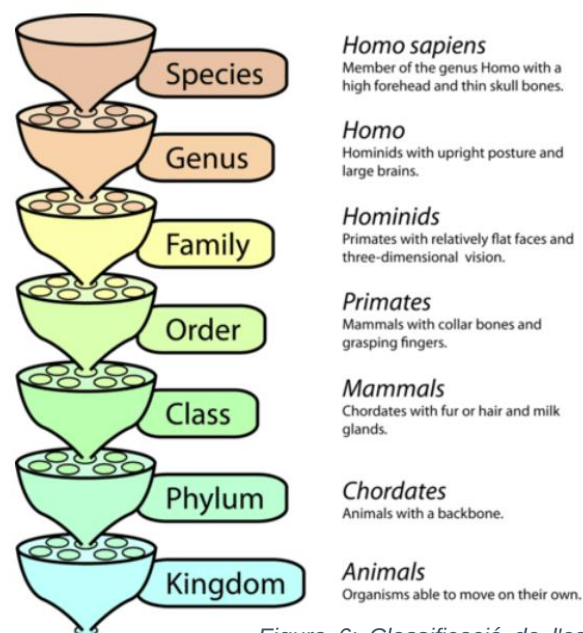


Figura 6: Classificació de l'espècie humana segons les regles de Linné (Linné et al.) (25).

La classificació emprada actualment per agrupar els diferents grups de microorganismes és la de Linné. En aquesta classificació se separen els éssers

vius en diferents nivells d'organització, anomenats taxons. Les categories taxonòmiques es classifiquen en nivells des de regne fins a espècie, i com més proper a l'espècie és el nivell, major és el nombre de característiques compartides i menor la distància evolutiva (figura 6). Aquest sistema permet anomenar totes les espècies amb un nom binomial, i que aquestes siguin diferents (25,26).

1.2.2 Bioma

Annex a la microbiota, en el microbioma s'inclou també el bioma. El bioma són les característiques del medi on viu la microbiota. El bioma, igual que la microbiota, no ha de ser necessàriament estable. Aquestes variacions o pertorbacions del bioma poden venir d'elements exteriors, com ara un augment de temperatura o l'acidificació del medi per productes del metabolisme dels microorganismes (27). Aquestes pertorbacions canvien les característiques del bioma, que es tradueix en un canvi en la microbiota del microbioma. Aquestes pertorbacions poden ser molt grans i comportar la pèrdua d'espècies o l'aparició d'altres de noves, o poden ser molt petites i modificar només les proporcions de les espècies (28). Per tant, quan parlem del microbioma humà, podem dir que el nostre cos és el bioma, i un canvi en alguna de les característiques de l'entorn, com per exemple l'augment de temperatura, pot alterar-lo.

1.3 Interaccions del microbioma

Els microorganismes del microbioma no es troben aïllats, sinó que es troben en contacte amb altres microorganismes i amb el bioma mateix, amb els quals interactuen.

1.3.1 Interaccions dels microorganismes amb el bioma

Les interaccions entre els microorganismes i el bioma són principalment l'alteració d'aquest bioma, que pot ser causada pels microorganismes o per condicions exteriors, i que provoca una modificació dels microorganismes que hi conviuen. Els canvis exteriors normalment provenen d'una modificació de les condicions de biomes propers. Per exemple, l'augment de la temperatura genera un augment de les temperatures del bioma (29). Un exemple de modificacions per part de la microbiota pot ser l'acidificació del medi, que provoca la desaparició d'espècies més sensibles a un pH baix. En alguns casos, hi ha microbiotes que

tenen un nivell de complexitat més elevat en la relació amb el bioma. Un exemple és la microbiota que trobem dintre d'éssers vius, com pot ser la microbiota intestinal. En aquest cas, la interacció pot ser més complexa degut al fet que es tracta d'un bioma amb un gran nombre de canvis, generats per l'ésser viu i per les condicions externes (30,31).

1.3.2 Interaccions entre els microorganismes

El microbioma és complex, amb moltes espècies de microorganismes que realitzen un gran nombre d'interaccions entre ells a nivell individual. Aquestes relacions s'anomenen simbiosis. Les principals interaccions entre microorganismes es defineixen com a (32) (figura 7):

- Mutualisme: és una relació entre dues espècies en la qual totes dues en surten beneficiades.
- Comensalisme: és una relació entre dues espècies en la qual només una en surt beneficiada, però l'altra no en surt perjudicada.
- Depredació: és una relació entre dues espècies en la qual només una en surt beneficiada i l'altra en surt perjudicada.
- Competència: és una relació entre dues espècies on totes dues en surten perjudicades. De competència, en tenim de dos tipus:
 - Per interferència: una espècia sintetitza compostos que inhibeixen l'altre microorganisme.
 - Per explotació: tots dos microorganismes utilitzen el mateix recurs, per tant es redueix la quantitat de recurs essencial per als dos microorganismes.
- Especialització: dues espècies de microorganismes fan servir la mateixa font d'energia o aliments i una aprèn a utilitzar-ne altre per no competir per la font.

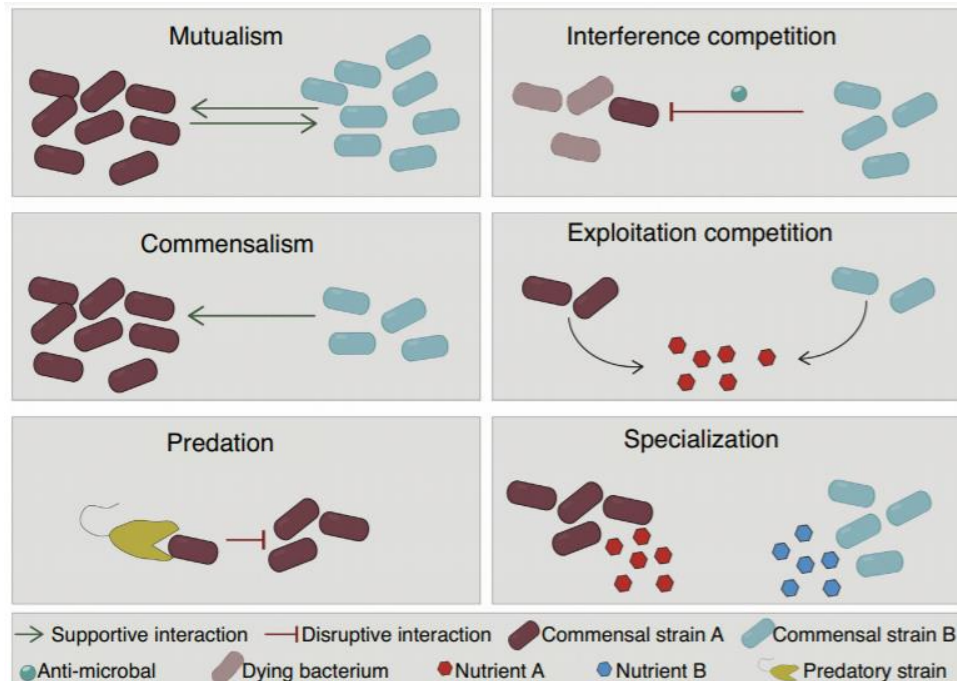


Figura 7: Interaccions entre microorganismes d'un microbioma (Kern et al., 2021)(32).

1.4 Mètodes d'estudi de la microbiota i el microbioma

Hi ha un gran nombre de tècniques que s'utilitzen per estudiar tant el microbioma com els seus components per separat, la microbiota i el bioma. Aquests mètodes dependran de l'objectiu de l'estudi i són els següents (33,34):

- **Culturòmics:** l'ús de diferents medis de creixement i diferents condicions de creixement, per després identificar els diferents microorganismes aïllats en els diferents medis de cultiu. És una tècnica amb un biaix molt elevat, ja que només es pot detectar aquella població per a la qual es compleixin les condicions de creixement. A més, segons l'afinitat al medi, creixeran en una proporció diferent a la real, per la qual cosa es tracta d'una tècnica només qualitativa. Només es poden observar els microorganismes que es troben vius a la mostra, però no es detecten els microorganismes no cultivables, però si viables.
- **Anàlisi d'amplificació i seqüenciació d'un amplicó:** l'amplicó és un fragment d'ADN amplificat per una polimerasa. Aquesta tècnica es basa en l'amplificació d'un gen comú en un grup de microorganismes i, posteriorment, la seqüenciació d'aquest amplicó. Després, s'analitzen les petites diferències en l'amplicó, que són específiques de cada espècie.

Aquest estudi només permet l'obtenció dels microorganismes que continguin aquest gen, per tant és una tècnica semiquantitativa, ja que la polimerasa pot augmentar alguna seqüència depenent de l'atzar (figura 8). Dintre dels gens més utilitzats es troben les regions hipervariables, com ara la regió V3-V4 del gen 16s per a bacteris i arqueus, o les regions espaciadores transcrites internes (ITS) per a eucariotes.

- Seqüenciació per *Shotgun*: seqüenciació de tot l'ADN present en la mostra. Aquesta seqüenciació divideix l'ADN en petits fragments, que se seqüencien. Cadascuna d'aquestes seqüències s'anomena *read*. Després s'analitza a quines espècies pertanyen els *reads*, i així s'obté la informació de les espècies del microbioma. A més, si aquests *reads* pertanyen a proteïnes, la seqüenciació per *Shotgun* permet l'estudi de les principals proteïnes en aquests, i les possibles rutes metabòliques que la microbiota pot utilitzar (figura 8).

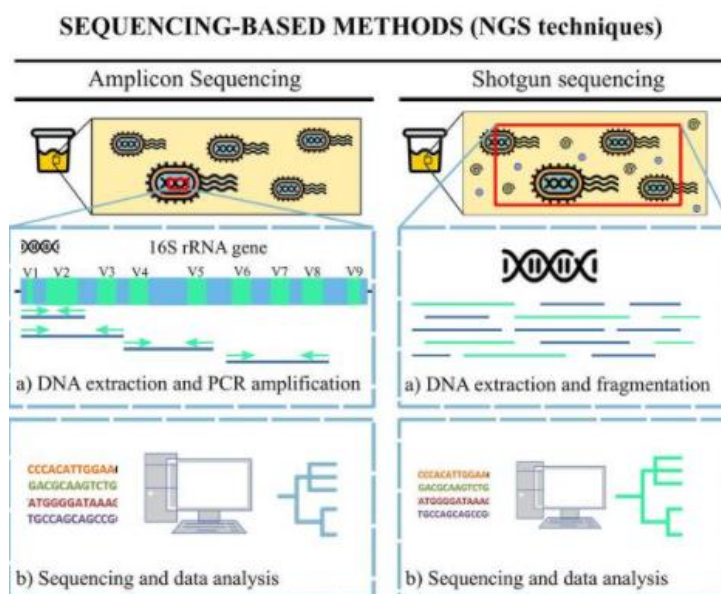


Figura 8: Diferències entre el mètode de seqüenciació mitjançant amplicons, amb el gen més emprat, i la seqüenciació per shotgun (Galloway-Peña et al 2020) (33).

- Metabolòmica/metaproteòmica: és l'estudi en la població d'un producte present en el microbioma, que pot ser un metabòlit d'una ruta metabòlica o una proteïna. Es realitza la quantificació i la caracterització de les diverses formes presents en la mostra de l'element en estudi.
- Metatranscriptòmica: seqüenciació de l'ARN present a la mostra, mitjançant la qual s'obtenen *reads* que pertanyen a qualsevol ARN dels microorganismes en la mostra. Ens permet l'estudi de la microbiota

metabòlicament activa per esbrinar quin tipus d'activitat expressen els gens i en quina proporció expressen. Aquesta tècnica permet estudiar les espècies metabòlicament actives, les principals rutes per les quals s'han generat transcrits. Té un fort biaix degut al fet que no es pot determinar si hi ha cap tipus de regulació postranscripcional que afecti a l'expressió del gen del qual prové el transcrit.

1.5 Microbioma humà

En els últims anys, s'han iniciat estudis de microbioma en l'ésser humà en els quals s'ha determinat el microbioma humà. S'ha estudiat des de les regions on se'n coneixia l'existència, com ara l'intestí, la pell o les vies respiratòries, fins a regions inicialment suposades estèrils, com la pròpia bufeta, on recentment s'ha determinat l'existència de bacteris que la colonitzen. S'ha demostrat que molts dels microorganismes no són perjudicials, sinó que tenen efectes beneficiosos per al seu hoste (35). Aquest plantejament s'ha exportat a estudis de salut humana, on s'ha comprovat la relació d'una alteració de la microbiota, anomenada disbiosi, amb diverses malalties. S'ha observat una disbiosi en diversos processos patològics, molts sense causa infecciosa, com pot ser el càncer urinari, que produeix una disbiosi tant a la microbiota intestinal com urinària (36).

Després dels primers estudis de la microbiota i la seva capacitat de modificació en cas de malaltia, el 2009 es va iniciar el «Human Microbiome Project» (HMP) (28,31). Aquest projecte es va centrar en seqüenciar el microbioma complet de persones sanes, amb la intenció de tenir una base de dades (BBDD) de microorganismes presents en la persona sana i microbiomes de referència amb els quals comparar els microbiomes en posteriors estudis sobre processos patològics. Els microbiomes que s'han descrit en el projecte són el de la mucosa nasal, el de la mucosa intestinal, el de la mucosa vaginal i el de la pell. En un inici, no es van tenir en compte microbiomes com l'urinari, atesa la creença que era estèril (35). El projecte es va dividir finalment en dues parts. A la primera part, que s'observa en la figura 9, en la primera part del projecte es va seqüenciar la microbiota dels microbiomes esmentats i se'n van descriure les funcions i les vies metabòliques. A més, es va seqüenciar el genoma humà dels individus estudiats

i es va intentar caracteritzar, aïllar i circularitzar els cromosomes dels microorganismes. A la segona part del projecte, la qual encara s'està desenvolupant, es van escollir tres afeccions diferents, nens nascuts prematurament, prediabetis i malaltia inflammatòria intestinal. En aquesta segona partel projecte consta de les mateixes anàlisis que l'anterior, , però també hi van incloure l'estudi del viroma i diferents perfils, com el perfil de citocines o epigenètics entre d'altres. En aquesta segona part, a més, es van realitzar monitoratges dels casos de l'estudi per veure com aquest microbioma varia amb el temps en cada afecció en estudi.

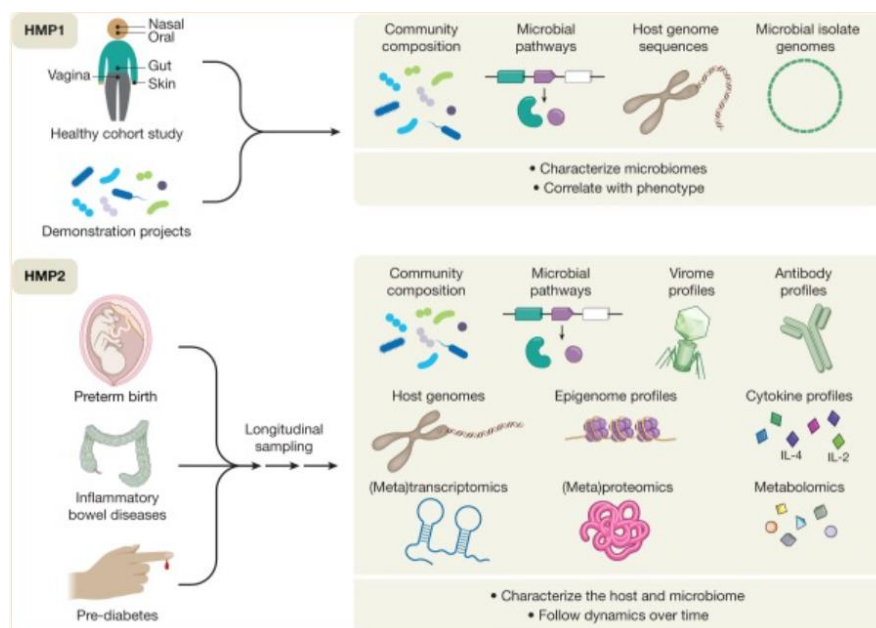


Figura 9: Esquema de Human Microbiome Project. A l'HMP1 tenim la primera part del projecte, on es va seqüenciar el microbioma de persones sense cap malaltia, mentre que en la segona part, l'HMP2, es va seqüenciar el microbioma de tres afeccions (adaptat de Schwartz, 2019)(28).

Després de diversos estudis i la seva comparació amb el projecte, es va concloure que en la població sana es pot trobar un gran nombre de microbiomes diferents (37). Cadascun dels diferents microbiomes s'agrupa segons la proporció de soques semblants sota el concepte de tipus, per tant cada tipus agrupa tots els microbiomes que recullen un conjunt semblant de poblacions microbianes, en funció de la diversitat esperada del microbioma. En l'estudi dels microbiomes, atesa la baixa estandardització i la manca d'una metodologia de referència, sempre es realitza la comparació entre el microbioma sa i el de l'afecció en estudi per tal de descriure quines espècies varien. (38,39).

La microbiota del microbioma humà té diverses funcions, algunes dels quals són essencials per al correcte desenvolupament de l'ésser humà o del sistema on es troba (40) (figura 10):

- **Funció metabòlica:** permet la síntesi d'aminoàcids, l'assimilació de productes que l'ésser humà no pot degradar o la generació de compostos de defensa com els àcids de cadena curta.
- **Funció estructural:** ajuda la vascularització d'alguns teixits o les unions entre cèl·lules, o confereix les propietats necessàries específiques de cada mucosa.
- **Funció protectora:** per competir pels aliments amb possibles patògens, educar la immunitat adaptativa o segregar productes antimicrobians.

1.5.1 Microbioma urinari

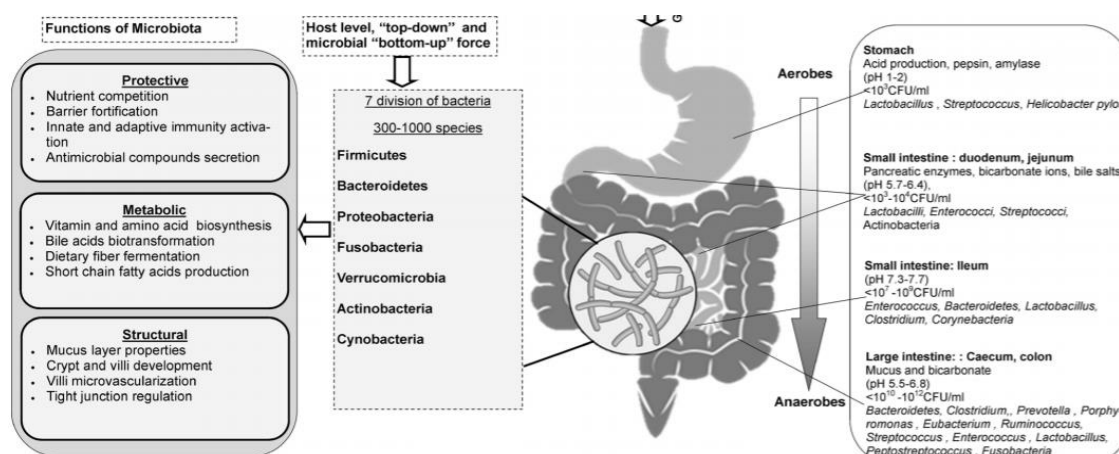


Figura 10: Microbiota intestinal amb les principals funcions que realitza la microbiota per a l'ésser humà (Adaptada de Adak & Khan, 2019)(40).

Històricament, el tracte urinari s'ha considerat estèril, fins que al 2016 diversos investigadors van descobrir l'existència d'un microbioma urinari. És un microbioma que no es analitza de forma directa, a causa de la obtenció de mostra ideal es per punció suprapúbica, la qual és invasiva i suposa riscos. Per això es realitza una recollida d'orina obtinguda per micció espontània o per sondeig en les millors condicions possibles(41). La microbiota urinària conté uns microorganismes habituals, però també microorganismes de transició, que són aquells que intenten pujar per la uretra, però no aconsegueixen establir-s'hi i proliferar. S'observen diferències entre dones i homes degut a les diferències estructurals anatòmiques de la uretra en ambdós sexes (8). També s'han

observat altres factors com els hormonals o la composició de l'orina, la concentració de calci i oxalacetat com a responsables de variacions de la microbiota (42).

La microbiota urinària està constituïda per més de 50 gèneres de microorganismes. Els gèneres més comuns pertanyen al grup dels bacteris productors d'àcid làctic (BAL), concretament *Lactobacillus* i *Streptococcus*, els quals se suposa que tenen un paper de defensa contra els patògens mercès a la seva capacitat d'acidificar el bioma. Altres gèneres, com ara *Alloscardovia*, *Burkholderia*, *Jonquetella*, *Klebsiella*, *Saccharofermentans* i *Rhodanobacter*, s'hi troben amb menor freqüència i es consideren microbiota de transició (43). Els gèneres de transició es detecten en major proporció en dones que en homes. Aquests microorganismes es poden trobar tant dintre de les cèl·lules de l'uroteli com adherits a la seva paret gràcies als aminoglucòsids de les membranes, que formen un biofilm (44).

1.5.2 Microbioma vaginal

El microbioma vaginal es troba exposat a contínues secrecions, canvis hormonals i influències externes. Altres factors, com ara l'edat, l'embaràs o el tabaquisme, també poden modificar el microbioma vaginal. El microbioma no és estable durant el cicle menstrual; la màxima estabilitat es produeix durant el pic d'estrògens. També s'ha observat que les dutxes vaginals i l'activitat sexual poden provocar disbiosis temporals en el microbioma vaginal (45,46).

El perfil de microbiota majoritari és aquell en què predominen els BAL, concretament el gènere *Lactobacillus*, que és l'encarregat de reduir el pH vaginal, la qual cosa confereix protecció contra microorganismes patògens. Hi ha autors que indiquen que una microbiota vaginal sana ha de tenir més d'un 50 % d'abundància relativa del gènere *Lactobacillus*. Tot i això s'han observat dones sense símptomes que no tenien una comunitat en la que *Lactobacillus* fos predominant. Aquest fet s'ha documentat en la majoria de dones menopàusiques, en les quals s'ha observat que la reducció de la càrrega d'hormones permet el creixement d'altres BAL. S'ha observat que els *Lactobacillus* són els BAL que produeixen un pH més baix, i que aquest pH no només depèn del gènere, sinó també de l'espècie de *Lactobacillus*. S'ha vist que

les dones amb BAL que no acidifiquen molt el pH, com ara *L. Iners*, o amb BAL que no són *Lactobacillus* són més propenses a tenir una diversitat major en el seu microbioma vaginal (45,47,48).

1.5.3 Microbioma intestinal

L'intestí està habitat per trillions de microorganismes, que poden ser molt diferents entre la població sana. S'ha observat una gran variabilitat en la microbiota segons l'edat, la dieta, la microbiota oral, la ubicació geogràfica, l'estrès, la medicació base, el part natural, el mètode d'alimentació a l'inici de la vida, i fins i tot la regió de l'intestí d'on s'ha obtingut la mostra. Els estudis del microbioma intestinal es basen en la recollida de femtes, per tant s'hi valoren les espècies del tram final i més divers de l'intestí. El microbioma intestinal s'inicia abans del part, amb la colonització de microorganismes provinents de la placenta, que actuen com a colonitzadors primaris del tracte intestinal. Aquests colonitzadors primaris, que trobem en el meconi, són molt diferents dels que acabaran establint-se com a primera microbiota estable en l'ésser humà (49).

A l'intestí trobem més de 1500 espècies, principalment dels fílums Bacteroides i Firmicutes, seguits d'altres grups com Proteobacteria, Fusobacteria, Tenericutes, Actinobacteria i Verrucomicrobia, que conformen el 90 % de les espècies bacterianes que colonitzen el tracte intestinal. Més del 70 % dels microorganismes pertanyen al domini Bacteria i, d'aquests, el 99 % són anaerobis o anaerobis facultatius. La resta de taxons pertanyen a fongs, protists, arquees i virus. A la figura 11, s'observen els diferents gèneres més abundants segons la part de l'intestí que vulguem estudiar (49,50).

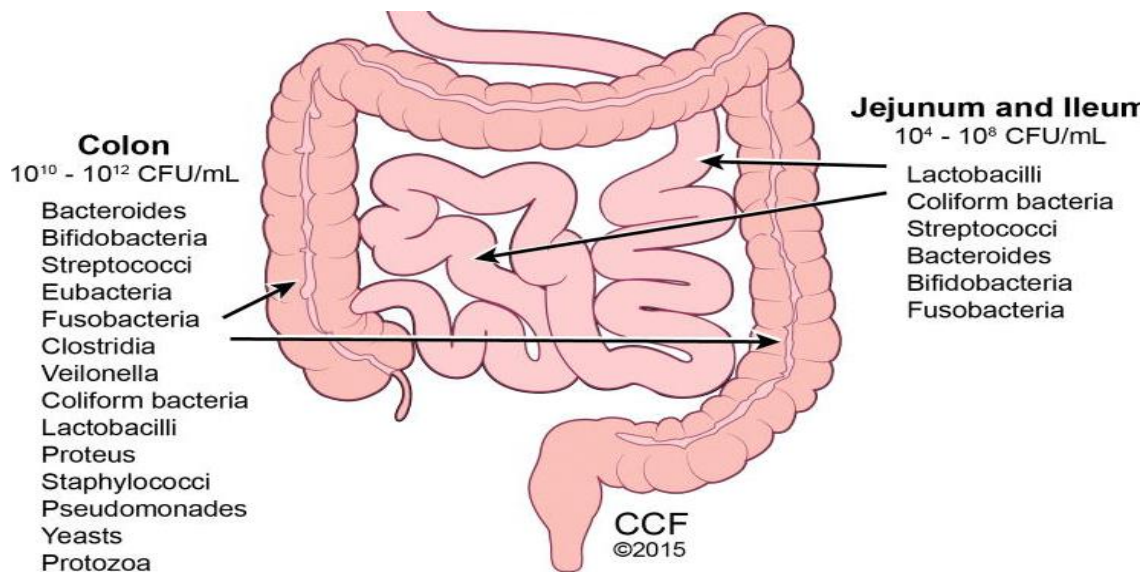


Figura 11: Principals grups de microorganismes en tot l'intestí (adaptat de Muhleisen et al)(47).

Una gran quantitat de factors poden modificar aquesta microbiota, que es pot veure afectada tant per condicions fisiològiques normals, com la dieta, com per la presa d'antibiòtics entre d'altres. Aquestes modificacions generen una disbiosi en el sistema que es pot acompanyar de símptomes, signes clínics o malalties (28,51).

1.6 El microbioma humà en la malaltia

Tot i que el microbioma pot no ser sempre estable, en certes malalties no exclusivament infeccioses es detecta una disbiosi en la microbiota. Les disbiosis poden ser causades per un desplaçament de la microbiota per l'arribada d'un microorganisme nou (sigui el causant de la malaltia o no) o per l'alteració en les condicions del microbioma, com per exemple l'augment del pH o la temperatura (52,53). Un dels factors més estudiats en els últims anys respecte a la microbiota són les espècies productores d'àcids grassos de cadena curta (SCFA). Els SCFA regulen els processos inflamatoris a l'intestí, i se n'ha observat la disminució en diverses malalties (54). En un gran nombre de les malalties infeccioses s'observa clarament aquest desplaçament de la microbiota, com en les diarrees associades a *Clostridiodes difficile* (DACD) (55). S'ha arribat a realitzar trasplantaments de microbiota intestinal d'un individu sa a un de malalt per tractar la DACD. De fet,

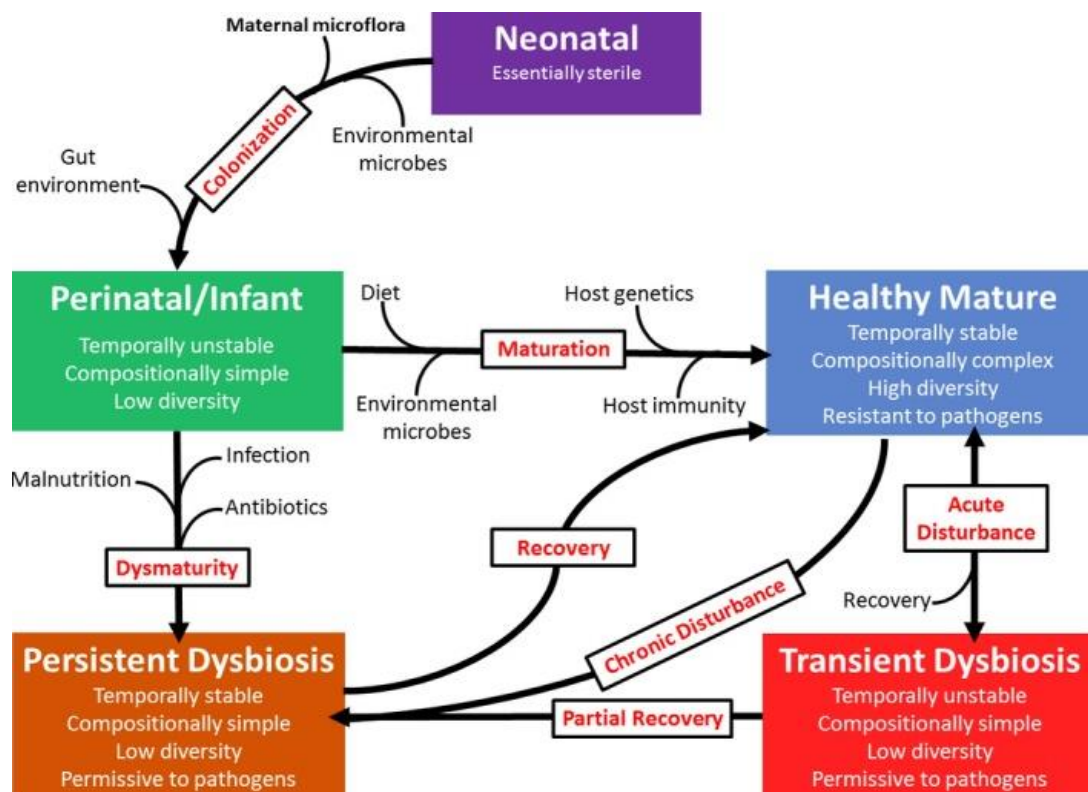


Figura 12: Dinàmiques de canvi de la microbiota intestinal (figura de Barko et al. 2017)(51)

és part de l'estratègia terapèutica consolidada per al tractament d'alguns pacients amb aquesta malaltia i forma part dels tractaments habituals per guarir el malalt amb DACD recurrent degut al seus bons resultats, que s'han replicat diverses vegades (55,56). El microbioma, que prové d'una colonització en el nou-nat, pot madurar de manera sana (figura 12). Aquesta microbiota pot patir un efecte que en generi la modificació cap a una microbiota amb una disbiosi, temporal o permanent, que pot generar problemes en la salut(51).

1.6.1 El microbioma humà en la malaltia urinària

En la malaltia urinària en l'ésser humà es troben relacionats els tres microbiomes descrits anteriorment, l'urinari, el vaginal i l'intestinal. S'han descrit diferències en les microbiotes urinàries de pacients amb incontinència urinària respecte de la microbiota urinària habitual, i Gajer *et al.* defensen que aquesta alteració podria tenir un paper rellevant en la patogènia de la malaltia (44). En un estudi realitzat en dones amb cistitis, es va observar una major prevalença dels gèneres *Eggerthella* i *Clostridium* en mostres d'orina obtingudes per micció espontània. En estudis més recents s'ha observat que variacions en els altres microbiomes

relacionats amb el de l'aparell urinari poden ser factors de risc en la malaltia urinària (57). En nounats, s'ha observat com donar el pit protegeix contra les ITU, degut al fet que l'alta concentració de bifidobacteris, provinents de la llet materna, desplacen les *E. coli* de l'intestí. També s'ha observat, en la microbiota intestinal de nens i nenes més propensos a desenvolupar ITU, que tenien una concentració més elevada d'*Enterobacter* i menor de *Peptococcus* (8). Encara que no s'ha demostrat la variació de la microbiota vaginal amb malalties urinàries, Magruder *et al.* han descrit la connexió ITU-microbiota intestinal determinant que una major quantitat d'*E. coli* pot produir un major desplaçament cap a l'aparell urinari i produir infecció. En aquest camí, trobem que el microbioma vaginal actua com a mecanisme de defensa mitjançant la disminució del pH per part de la microbiota vaginal, per tant una disbiosi d'aquesta podria provocar un augment d'ITU en la dona (8,43,58,59). No tenim coneixement de cap estudi que hagi estat capaç de descriure variacions de la microbiota intestinal o de la vaginal en les dones afectes d'ITUr.

1.7 Viroma

El viroma és el conjunt de virus d'un microbioma. Els components del viroma es poden separar en 2 grups: el viroma pròpiament dit, format pel conjunt de tots els virus (tot i que normalment parlem de virus d'eucariotes que afecten l'hoste), fongs o paràsits dintre del microbioma, i el fageoma, que és el conjunt de tots els virus que infecten les poblacions procariotes del microbioma. El viroma pot influir indirectament en el microbioma, modificant l'ambient degut a l'efecte en l'hoste, i directament en les poblacions de microorganismes eucariotes. Per contra, el fageoma actua directament sobre la població de bacteris.

El fageoma és la part predominant del viroma d'una persona adulta, ja que representa aproximadament el 90 % del material gènic del viroma (60). Igual que succeeix amb el microbioma, en algunes malalties s'ha observat que les proporcions de virus del viroma estan alterades (figura 13).

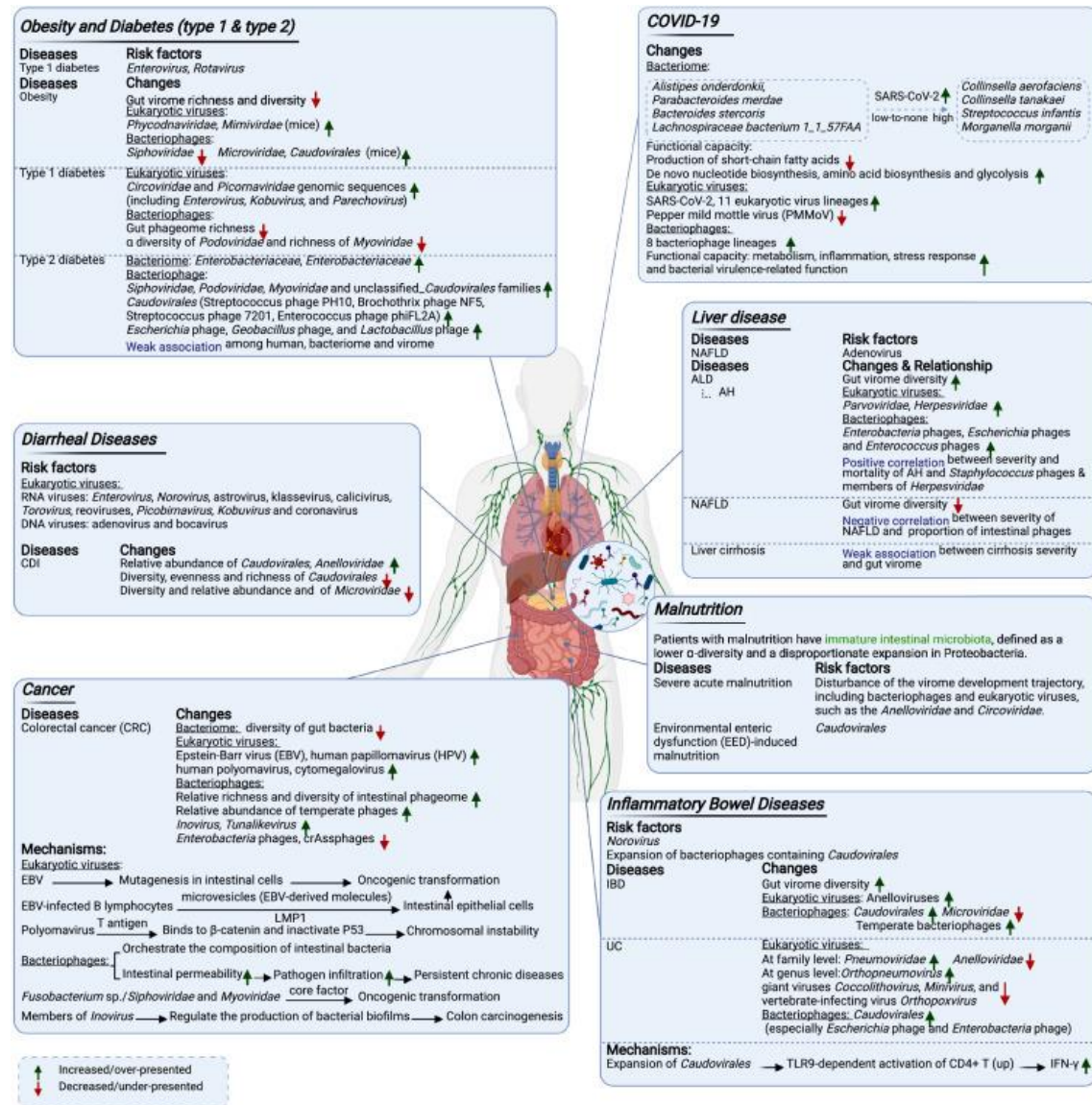


Figura 13: Gèneres de virus que varien en determinades malalties (figura adaptada de Shareefdeen et al. 2022)(61).

Tot i que s'han observat aquestes modificacions en moltes malalties, encara no està clar per què alguns virus predominen sobre d'altres, en funció de la malaltia, mentre que pot ser que la població microbiana no variï (61).

2 Hipòtesis

El 50 % de les dones patiran almenys una ITU un cop al llarg de la seva vida, i d'aquestes, entre el 10 % i el 20 % patiran ITU recurrents (ITUr).

Els factors de risc per presentar ITUr són les relacions sexuals o la presència d'anomalies, tant funcionals com anatomopatològiques, de l'aparell urinari. En l'actualitat, no es coneix quins factors determinen l'evolució d'un episodi únic d'ITU cap a una ITUr en les dones que no tenen cap dels factors predisponents.

S'ha descrit la presència de disbiosi en la microbiota intestinal, vaginal i urinària en diferents malalties, entre elles les ITU, i en la incontinença urinària, però no tenim constància que mai s'hagi aconseguit relacionar aquets canvis amb les ITU recurrents.

Aquest treball parteix de la hipòtesi que pot existir una relació entre les disbiosis en les microbiotes fecal, vaginal o urinària en les dones que desenvolupen ITUr. A més, es planteja la hipòtesi que hi hagi relacions entre els gens i les rutes metabòliques detectats amb més freqüència i l'aparició d'ITUr.

3 Objectius

3.1 Objectiu principal:

- Descriure les característiques de la microbiota intestinal i vaginal de les dones amb ITUr i comparar-la amb les de les dones control (sanes).

3.2 Objectius secundaris:

- Caracteritzar el microbioma vaginal i intestinal de les dones control, descrivint tant bacteris com arqueus, fongs o paràsits.
- Documentar el viroma humà intestinal i vaginal i descriure si es modifica en les dones amb ITUr.
- Caracteritzar els possibles determinants d'ITUr mitjançant l'estudi dels gens i les rutes metabòliques de la microbiota estudiada.
- Determinar els gens de virulència i resistència als antimicrobians que trobem en la microbiota de les dones amb ITUr, i comparar-los amb les de les dones control.

4 Material i mètodes

4.1 Població d'estudi

El nombre de participants s'ha calculat mitjançant un algoritme desenvolupat per Monleón (62) que tracta d'optimitzar els resultats obtenint la major sensibilitat amb la millor relació cost-benefici. Aquesta aproximació es basa en la corba de saturació de la biodiversitat de les mostres per determinar el nombre mínim de pacients necessari per garantir una potència estadística adequada. Concretament, s'ha determinat que es requereix un mínim de 30 pacients per aconseguir aquest objectiu. Aquest és un estudi de casos i controls, on s'han recollit mostres de 94 dones majors d'edat distribuïdes en 50 pacients i 44 controls.

Les dones cas per a l'estudi són dones reclutades en les consultes externes de la Unitat d'Urologia Funcional de la Fundació Puigvert i de la Unitat de Malalties Infeccioses de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau on havien acudit a consulta per sospita d'ITUr. Es van definir com a casos les dones que havien rebut un diagnòstic d'ITU en un mínim de dues ocasions en els últims sis mesos, o en tres o més ocasions en l'últim any. Les dones cas reclutades en l'estudi van ser aquelles que entraven dintre del grup d'estudi que complia el criteri d'inclusió per considerar-les pacients d'ITU i que no complien cap dels criteris d'exclusió.

Les dones control es van reclutar al Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre dones sanes sense cap malaltia rellevant que acudien per a les seves revisions ginecològiques rutinàries.

Totes les participants són majors de 18 anys i tenen capacitat per respondre les preguntes de l'enquesta (Annex), i van firmar el consentiment per participar en l'estudi entre el juny de 2020 i el juny de 2022.

4.1.1 Criteris d'exclusió de l'estudi:

- Ús d'antibiòtics, probiòtics, gerds o qualsevol altre tractament per reduir la possibilitat d'ITUr en els últims 6 mesos.
- Haver tingut ingrés a un hospital d'aguts o un centre sociosanitari durant l'any posterior a l'estudi.
- Treballadores de centres sanitaris.

- Portadores de sonda vesical.
- Amb malalties inflammatòries de les vies urinàries o intestinals cròniques sense causa bacteriana.
- Bufeta neurògena i altres alteracions pèlviques o funcionals que produeixin residu postmiccional.
- Embarassades.
- Amb malalties hematològiques o immunològiques o en tractament amb immunoteràpia.

Si la participant retira el consentiment informat, se'n retiraran la mostra i les dades de l'estudi.

S'ha obtingut una mostra d'orina per micció espontània, una mostra de femta i una mostra de frotis vaginal de totes les participants en l'estudi. Totes tres mostres han estat obtingudes de forma autònoma per les participants després de rebre l'explicació i les instruccions per escrit. Alhora, s'ha emplenat un qüestionari, on s'incloïen diverses variables demogràfiques i hàbits higiènics, i s'ha fet una enquesta sobre símptomes digestius, urinaris i del sòl pelvià (annex) amb l'ajuda del metge o metgessa responsable.

Per a l'anàlisi del sòl pelvià s'ha utilitzat una enquesta, Pelvic Floor Inventory Questionnaire Sort Form 20 validada pel seu ús en castellà (63) amb preguntes que es puntuaven entre de 0 a 4, on el 0 equival a «No» i el 4 a «Molt molesta». Les puntuacions de cada pregunta s'han sumat i s'ha generat la variable denominada «puntuació del sòl pelvià», on els valors més alts reflexen una major afectació de la musculatura pelviana (annex). Els resultats amb les metadades per pacient es troben a l'arxiu *Sequence Read Archive* (SRA) amb el codi *Bioproject* PRJNA1133690.

4.1.2 Anàlisi estadística de la població estudiada

S'han analitzat les diferents variables de les pacients realitzant-ne un estudi descriptiu i, posteriorment, s'ha observat si hi ha diferències significatives entre les dones amb ITUr i les control. L'anàlisi estadística de les variables numèriques s'ha realitzat mitjançant una prova *t* de Student, mentre que per a les variables categòriques s'ha realitzat una χ^2 . S'han acceptat com a significatius els valors d' α inferiors a 0,05.

4.2 Estudi d'infecció d'orina

El diagnòstic microbiològic per descartar una ITU s'ha realitzat segons el procediment normalitzat de treball (PNT) per a l'avaluació d'orines del Servei de Microbiologia de l'Hospital de Sant Pau. Per dur a terme l'estudi, s'observa el sediment d'orina al microscopi i, si s'hi detecten elements cel·lulars o gèrmens amb la tinció de Gram, es fa un urinocultiu d'acord amb el mateix PNT del Servei de Microbiologia.

Per a l'observació del sediment d'orina, se centrifuguen 10 ml d'orina a 3000 revolucions per minut (r.p.m). Es descarta el sobrenedant i s'observa el sediment al microscopi a 400 augments per tal de comptabilitzar les cèl·lules de descamació epitelial, els leucòcits i els glòbuls vermells. Es fa una observació d'una mitjana de 10-15 camps, i es classifiquen com a sospita d'infecció d'orina aquelles mostres amb un nombre superior a 5-10 leucòcits per camp.

L'examen del sediment amb tinció de Gram ens permet l'observació de la quantitat, coloració i morfologia dels bacteris presents a l'orina. Si en l'estudi de la bacteriúria trobem una població monomicrobiana no compatible amb morfologies de lactobacils, es procedirà a realitzar un cultiu en agar cromogen (CPS, BioMerieux) i una posterior identificació per MALDI-ToF (64,65).

4.3 Recollida i extracció del material genètic

4.3.1 Mostres vaginals

La recollida del frotis vaginal s'ha realitzat mitjançant el medi de conservació *OMNIgene•VAGINAL* | OMR-130 (66). Per a la recollida, cal introduir l'hisop a la vagina i fer-lo lliscar durant uns 30 segons per les parets vaginals. Posteriorment, es desa en el tub amb medi de conservació.

L'extracció de l'ADN s'ha realitzat mitjançant el kit *masterPure Complete ADN and RNA Purification kit* (67) (Biosearch Technologies, Anglaterra). S'ha escollit el protocol d'extracció d'ADN amb tractament de lisi cel·lular i tractament amb una RNAsa per eliminar l'ARN contaminant en la mostra.

4.3.2 Mostres fecals

La recollida de femta s'ha realitzat mitjançant el kit *Stool Sample Collection & Stabilization Kit* (68) (Canvax, Espanya) en mostres de femta per deposició. Per

a l'obtenció de la mostra es va recollir un gram de femta (aproximadament la cullera que té el kit) i es va dissoldre en el líquid del kit.

Per a l'extracció de l'ADN, es va utilitzar el *kit HigherPurity™ Stool ADN Isolation Kit* (69). S'han realitzat les següents modificacions en el protocol:

- L'extracció s'ha realitzat amb 1 ml de dissolució del conservant amb la femta i no amb 200 grams de femta pura.
- S'ha allargat a 30 minuts la primera incubació a 75 °C i, després, s'ha realitzat una segona incubació de 10 minuts a 90 °C.
- La segona incubació s'ha realitzat a 50 °C afegint-hi 10 µl de proteïnasa K.

4.4 Seqüenciació

4.4.1 Control de qualitat

S'ha realitzat una anàlisi de qualitat de l'extracció. La concentració d'ADN s'ha quantificat amb *Qubit* (70) i se n'ha valorat la qualitat amb *Nanodrop* (71). La quantitat mínima requerida per procedir a la preparació de llibreries es va establir en 20 µg/ml, i la qualitat de l'ADN s'ha establert en un mínim d'1,8 en la relació d'absorbàncies A260:A280, la qual cosa indica una puresa mínima del 70 % d'ADN.

Les mostres s'han enviat a *Macrogen EUROPE*, on han dut a terme un segon control de qualitat i la posterior seqüenciació.

4.4.2 Preparació de llibreries

Un cop les mostres han complert tots els estàndards de qualitat, s'ha realitzat la construcció de llibreries. El kit utilitzat per construir les llibreries és el *TruSeq ADN PCR Free* (72) amb fragments de 350 parells de bases. Per valorar la qualitat de la llibreria, s'ha utilitzat el *Bioanalyzer ADN High Sensitivity*, en el qual s'ha acceptat una concentració d'1 ng/µl (73).

4.4.3 Seqüenciació

El procés de seqüenciació de les mostres s'ha realitzat en un *Illumina NovaSeq 5000* (74), mitjançant una seqüenciació per *shotgun*, que ha generat fragments de 150 parells de bases.

4.5 Anàlisis bioinformàtica

4.5.1 Preparació dels *reads* de la seqüenciació

Per a la determinació de la qualitat dels *reads*, s'ha utilitzat el *FastQC* (75) (disponible a <https://github.com/s-andrews/FastQC>), una eina que permet obtenir la mitjana de qualitat dels *reads* per mostra i ubicació. Després, per a la neteja dels adaptadors, les regions de baixa qualitat i els *reads* massa curts, s'ha utilitzat *BBDuk* del Joint Genome Institute (JGI) (disponible a <https://github.com/BioInfoTools/BBMap>). Els paràmetres utilitzats en la neteja han estat els següents:

- Eliminar els *reads* amb una longitud inferior a 50 parells de bases.
- Eliminar les bases amb una qualitat inferior a Q30 (Els fragments de *read* on tenim una possibilitat d'error del 0,1 %)

Un cop eliminats els adaptadors i les regions de baixa qualitat, s'ha comprovat de nou la qualitat amb *FastQC* (75).

L'últim pas del procés de qualitat ha estat eliminar l'ADN humà de les mostres, és a dir, tot l'ADN que no pertany al metagenoma. Per a l'eliminació de l'ADN humà, s'han comparat tots els *reads* de les mostres amb el genoma humà de referència (GRCh38.p14/hg38(76)) amb el programa per *mapar bowtie2* (77,78) (disponible a <https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/>). En el fitxer resultant del mapatge, s'han eliminat els *reads* aparellats si almenys un dels dos contenia una regió homòloga amb el genoma humà. L'etiqueta seleccionada a *bowtie2* per a aquests *reads* ha sigut la 12, amb els paràmetres per defecte.

4.5.2 Classificació taxonòmica dels regnes Bacteria, Eukarya i Arquea

Per a l'anàlisi poblacional, s'han seleccionat els *reads* sense ADN humà amb el programari GAIA (79), desenvolupat per Sequentia SL per detectar a quina espècie pertany cada *read* segons el grau de semblança. Per realitzar aquesta assignació, s'han agrupat les seqüències amb una homologia superior al 97 % i s'ha generat una seqüència consens —aquests conjunts d'organismes agrupats per la similitud del seu ADN es coneixen com a *operational taxonomic units* (OTU). Les OTU s'han confrontat amb la base de dades Sequentia Biontect MICK, que conté informació de microorganismes (Arqueus, bacteris, fongs i

protozoous) amb la seva taxonomia associada, i que assigna les OTU a un nivell taxonòmic segons els percentatge de similitud.

4.5.3 Taxonomia de virus bacterians (fags)

Per determinar les poblacions de fags, s'ha escollit un programa per classificar els *reads* en espècies, *FastviromeExplorer* (disponible a <https://github.com/saima-tithi/FastViromeExplorer>) (80) i, com a base de dades, s'ha escollit un catàleg publicat en el 2021 a la revista Nature per Nayfach *et al.* (81). La taxonomia de cada OTU vírica s'ha completat amb la informació de l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (82).

4.5.4 Assignació de funcions al microbioma

L'assignació funcional es va realitzar mitjançant la traducció dels *reads* i posterior alineament amb la base de dades *Uniprot*(83), *uniref90* (84) (disponible a <https://www.uniprot.org/help/uniref>), la qual conté totes les proteïnes d'*Uniprot* (83) i ha agrupat per funció aquelles proteïnes que es diferencien en menys d'11 nucleòtids i a les quals no s'ha detectat una segona possible funció. El *mapador* que hem fet servir és el *DIAMOND* (85), que permet tant la traducció com l'alineament amb la base de dades. Un cop s'ha realitzat l'alineament, s'ha anotat amb *UPIMAPI* (disponible a <https://github.com/iquasere/UPIMAPI>), per *mapar* les diferent proteïnes amb les diferents rutes metabòliques (86) a partir dels codi *Uniprot* (83) obtinguts.

4.6 Anàlisi estadística dels resultats

L'anàlisi estadística dels rangs taxonòmics ha sigut comú tant per als microorganismes com per als virus.

Per poder realitzar l'anàlisi de les mostres amb les característiques de cada pacient, s'han unificat les dades de les OTU juntament amb les metadades de les pacients en un objecte anomenat *phyloseq*, que permet desar la informació de les pacients, les taules d'OTU i les taules taxonòmiques, i accedir fàcilment a funcions (87).

S'ha realitzat un procés de neteja de possibles OTU contaminants per tractar d'eliminar possibles falsos positius dintre de les mostres. En el primer pas, s'han eliminat totes les OTU on no hi hagués més de dos *reads* entre totes les mostres.

Després, s'ha fet una segona neteja d'OTU observant les proporcions dels *reads* que han emparellat en cada OTU i com varien les proporcions segons les concentracions d'ADN de cada mostra mitjançant el paquet R *decontam* (88).

En tots els models que s'han realitzat, s'han utilitzat les covariables d'edat, índex de massa corporal (IMC) i si la dona era menopàusica o no.

4.6.1 Estudi de la composició

Per poder realitzar l'anàlisi de la composició dels grups que comparem, s'han normalitzat els comptatges dintre de cada mostra. Cada taxó dintre de cada mostra s'ha normalitzat segons la següent formula:

$$Comptatges_normalitzats = \frac{comptatges_OTU}{Sumatori\ comptatges}$$

Un cop s'han normalitzat les OTU per gènere, s'han agrupat en el grup «Altres» aquelles que no fossin un dels 10 generes més representats en les mostres i s'ha fet una prova de Wilcoxon per a cada gènere, per tal d'estudiar el moviment de les grans poblacions de microorganismes.

4.6.2 Diversitat alfa

Per a l'estudi de la diversitat alfa, s'ha utilitzat l'índex de riquesa Chao1 (89) i els índex de diversitat de Shannon i Simpson (90-92). En l'anàlisi de la diversitat alfa, no s'han normalitzat els *reads* perquè la pròpia equació de l'índex normalitza els resultats. El càlcul dels tres índex es troba inclòs en el paquet R Vegan (93).

L'índex Chao1 (89) és un índex de riquesa que ens dona el nombre estimat d'espècies que trobem en el microbioma. L'índex corregeix el nombre amb la variància detectada en la pròpia mostra, tenint en compte aquelles espècies que s'han trobat en pocs dels microbiomes del conjunt de microbiomes de totes les mostres. D'aquesta manera, s'obté una puntuació menor per valorar-les com a falsos positius.

L'índex de Shannon s'expressa en una escala logarítmica. El valor 0 indica la presència d'una sola espècie, mentre que el valor màxim correspon a la situació en què totes les espècies són presents en la mateixa proporció. Per tant, un valor alt de l'índex de Shannon indica una gran diversitat d'espècies en un ecosistema.

A més, l'índex de Shannon és sensible a la presència d'espècies rares, ja que penalitza la seva baixa abundància relativa.

L'índex de Simpson proporciona una mesura de la probabilitat que dos individus escollits a l'atzar en un ecosistema siguin de la mateixa espècie. Si tots els individus en un ecosistema són de la mateixa espècie, l'índex de Simpson serà 1. A mesura que augmenta la diversitat d'espècies en un ecosistema, l'índex de Simpson disminueix.

Per a la valoració de l'efecte de la diversitat alfa, s'ha realitzat una prova de Wilcoxon per comparar els valors de cada mostra i observar la variació dintre de cada grup. Posteriorment, aquest efecte s'ha modelitzat mitjançant una regressió lineal amb el paquet Stats d'R, on s'ha observat l'efecte que hem volgut estudiar en l'índex de diversitat amb les covariables (figura 15) (94,95).

$$Diversitat\ alfa = Efecte\ en\ estudi + edat + IMC + menopausa \left(\frac{Si}{No}\right)$$

4.6.3 Diversitat beta

Per calcular la diversitat beta de les mostres, es va fer una normalització per *Trimed Mean of M-values* (TMM) per tal d'eliminar l'efecte de la seqüenciació de l'anàlisi, i després es va fer una matriu de distància de Bray-Curtis. Per poder analitzar aquesta matriu, es va fer una anàlisi per components principals. L'anàlisi per components principals es va realitzar mitjançant una anàlisi de coordenades de doble principi (dPCoA). Per modelitzar i eliminar el possible biaix que poden provocar les diverses covariables en la variable principal, es va fer una anàlisi d'ANOVA amb 1000 permutacions amb el paquet *stats*, aplicant la següent formula:

$$Diversitat\ beta = Efecte\ en\ estudi + edat + IMC + menopausa \left(\frac{Si}{No}\right)$$

4.6.4 Anàlisi diferencial

Per a l'anàlisi diferencial, es va realitzar un model per a cada taxó que tenim en el microbioma, utilitzant la variable d'estudi i observant els canvis de logaritme entre els diversos grups d'estudi, fent les correccions per a les diferents covariables segons la formula següent:

$$LFC \text{ OTU} = Efecte \text{ en estudi} + edat + IMC + menopausa \left(\frac{Si}{No}\right)$$

Per realitzar tots els models per a cada OTU, s'ha utilitzat el paquet ANCOM (96,97), que permet realitzar aquestes comparacions entre tots els taxons en estudi i permet eliminar els falsos positius. Per eliminar els falsos positius, hem ajustat els següents paràmetres:

- S'han eliminat de l'anàlisi tots aquells taxons que no es troben com a mínim en un 10 % de cada grup de l'estudi o del total quan la variable principal és contínua.
- Els taxons amb una representació inferior al 0,001 % dins de la mostra s'han tractat com si no s'haguessin detectat.
- Un cop elaborat el model, s'ha realitzat una correcció del valor de p per Benjamin Hochberg (BH) i Bonferroni per eliminar els taxons falsos positius degut a la mida mostral.

4.6.5 Estudi de biomarcadors

Per a l'estudi de biomarcadors, s'ha utilitzat l'algoritme del paquet *Coda4Microbiome* disponible a CRAN (98). S'ha realitzat un model amb la fórmula de sota:

$$Taxó \text{ marcador} = Efecte \text{ en estudi} + edat + IMC + menopausa \left(\frac{Si}{No}\right)$$

Després, s'ha escollit el model amb una millor separació de les mostres de la corba AUC-ROC i s'ha estudiat quins eren els microorganismes marcador que permetien el millor model i com s'han distribuït les mostres.

4.6.7 Perfils de microbioma vaginal

Respecte al microbioma vaginal, s'ha classificat cada participant de l'estudi en un dels 5 perfils determinats per l'algoritme VALENCIA (99). En aquest algoritme, es realitza la classificació segons el grau de similitud del microbioma amb un dels 5 tipus descrits pels autors, que són els següents:

- CST 1: predomina *L. crispatus*
- CST 2: predomina *L. gasseri*
- CST 3: predomina *L. iners*

- CST 4: predominen gèneres diferents del *Lactobacillus*, és a dir: *Streptococcus*, *Gardnerella*, *Bifidobacterium* i *Staphylococcus*
- CST 5: predomina *L. jensenii*

S'ha adaptat el codi original per poder-lo fer servir amb *shotgun* metagenòmica.

4.6.8 Anàlisi diferencial i enriquiment

Amb els comptatges del nombre de *reads* que s'han *mapejat* per a cada proteïna, s'ha realitzat primer una anàlisi diferencial i, després, un enriquiment. L'anàlisi diferencial s'ha fet amb DESEQ2, i s'han obtingut les proteïnes diferencialment detectades en les dones amb ITUr i en les dones control. Després, aquestes proteïnes s'han enriquit agrupant-les pels codis *Gene ontology* (GO) (100) i *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (101), que indiquen la funció de cada gen. Aquest enriquiment s'ha realitzat amb el paquet *fgsea* (102), que realitza l'enriquiment, permetent observar quines funcions es troben més en les dones amb ITUr i quines altres a les dones control.

5 Resultats i argumentació

5.1 Població estudiada

De l'enquesta realitzada a cadascuna de les 50 pacients i les 44 dones control que formen part de l'estudi, l'anàlisi de les variables numèriques mostra que la mitjana d'edat de les participants és de 46,2 anys i que tenen un IMC de 23,9 kg/m² (taula 1). No s'han trobat diferències significatives entre el 2 grups en aquestes variables, excepte l'augment significatiu de la puntuació del sòl pelvià en les dones amb ITUr ($p = 1,483 \times 10^{-5}$).

Entre les variables categòriques, s'ha preguntat per la freqüència de les relacions sexuals, i s'ha obtingut que el 12 % de les participants no eren sexualment actives en el moment de l'estudi i que el 52,2 % mantenen relacions sexuals almenys un cop per setmana. El 45,8 % de les dones son menopàusiques.

Variable	Mitjana dones amb ITUr (mínim-màxim)	Mitjana controls (mínim-màxim)	Valor de p
Edat (anys)	46,24 (18-76)	48,94 (20-76)	0,1644

IMC (kg/cm ²)	23,98 (16,26-41,72)	24,16 (16,26-37,87)	0,6845
Fills	1,42 (0-6)	1,42 (0-6)	0,4619
Ingesta d'aigua diària (l/dia)	1,59 (0-4)	1,4 (0-4)	0,8964
Puntuació pelviana	14,78 (0-44)	1,58 (0-10)	$1,483 \times 10^{-5}$

Taula 1. Principals variables numèriques de les participants en l'estudi. Els valors de p indiquen si la diferència entre els grups és significativa

Entre altres variables d'interès recollides en l'estudi són els hàbits dietètics, i s'ha observat que el 85 % de les participants no segueixen cap dieta específica (qualificada com a mediterrània en l'enquesta de l'annex),

No s'han observat diferències significatives entre ambdós grups, ni en l'activitat sexual ($p = 0,354$) ni en els hàbits dietètics ($p = 0,594$), ni tampoc en l'estat menopàusic ($p = 0,453$).

Així doncs, de les diferents variables estudiades entre ambdós grups, no s'observen diferències estadísticament significatives entre les dones amb i sense ITUr, excepte pel que fa a la puntuació de sòl pelvià. Els principals factors que afecten els microbiomes relacionats amb la microbiota vaginal descrits per Morsli *et al.*, com ara l'edat, l'estat hormonal o l'activitat sexual, s'han descartat com a efecte confusor degut a la no significació (103). Igualment, en les anàlisis subsequents s'ha decidit incloure les variables edat, estat menopàusic i IMC (dels quals s'han descrit variacions tant en la microbioma vaginal com en l'intestinal), per tal de reduir l'efecte que poguessin provocar (104). Atès que la puntuació pelviana ha resultat ser significativa, s'ha decidit valorar com afecta el seu increment només en les dones amb ITUr.

5.1.2 Estudi d'infecció d'orina

Del total de 94 mostres d'orina recollides, només en dues es va diagnosticar una ITU produïda per bacils gramnegatius, concretament per *Escherichia coli*, un dels uropatògens més habituals (12). Aquestes dues mostres també presentaven leucocitúria significativa. En 5 de 94 mostres, es va observar ≥ 25 cèl·lules de descamació epitelial per camp, la qual cosa és indicativa d'una possible mala recollida, però es va poder descartar la infecció urinària degut al fet que no

presentaven leucocitúria i que la tinció de Gram no va revelar cap morfologia compatible amb un uropatogen.

Per altra banda, 20 mostres mostraven més de 5 leucòcits per camp i 13 tenien més de 20 eritròcits per camp, fet que podria estar associat a processos inflamatoris o infecciosos del tracte urinari.

Finalment, en la tinció de Gram, 33 mostres presentaren bacils grampositius. D'aquestes, 28 tenien formes compatibles amb *Lactobacillus*, microorganisme predominant de la microbiota vaginal, mentre que 5 mostres mostraven bacils amb morfologia compatible amb *Gardnerella vaginalis*, patogen freqüentment associat amb desequilibris en la microbiota vaginal, compatible amb la vaginosi bacteriana (105). En el cultiu de totes les mostres, només les dues amb *E. coli* es van confirmar com a ITU activa.

En conclusió, només dues mostres de les dones amb ITUr varen presentar un episodi d'ITU activa en el moment de la recollida de la mostra, i en una tercera part es trobaren microorganismes compatibles amb la microbiota vaginal.

Un dels objectius de l'estudi era el de la seqüenciació genòmica dels microorganismes aïllats per tal de detectar diferències en els factors de virulència entre les soques aïllades en un grup i l'altre. Tanmateix, com que només hem aïllat dues soques, s'ha descartat per l'estudi atès que els resultats obtinguts no podien ser concloents.

5.2 Control de qualitat de l'extracció d'àcids nucleics i de la seqüenciació

El primer control de qualitat del procés de seqüenciació té lloc després de l'extracció d'ADN. De les 188 mostres recollides (fecals i vaginals), 4 (2 fecals i 2 vaginals) no van superar els criteris establerts. Aquestes mostres presentaven una concentració inferior a 20 ng/μl i una relació A260/A280 propera a 1,80, la qual cosa indicava una possible contaminació o insuficiència en la puresa de l'ADN. Per tant, van quedar excloses de l'estudi, i les mostres viables per a l'anàlisi van passar a ser 184.

Posteriorment, és important valorar el nombre de *reads* que s'obtenen i la fiabilitat dels mateixos. La mitja de *reads* per mostra vaginal fou de $3,03 \times 10^7$ i d' $1,53 \times 10^7$ *reads* per mostra fecal.

La qualitat de les seqüències, determinada pel *Q score*, dona una mitja de 32,5 (rang de 20 a 37), indicativa de bona qualitat, amb una probabilitat d'error del 0,001(106). No obstant això, es va detectar una lleugera disminució en la qualitat en les últimes bases (posicions 149-151), amb un *Q score* mitjà de 30,1. Aquesta disminució pot tenir lloc degut a la saturació del sensor. Al final del procés de filtratge i neteja, el 12,3 % dels *reads* en les mostres vaginals i el 8,6 % en les mostres fecals van ser eliminats per tenir una baixa qualitat.

Un dels problemes de la seqüenciació de mostres humanes és que a l'hora de fer l'anàlisi per a la cerca de microorganismes, cal eliminar aquells *reads* que es corresponguin amb l'ADN humà i així es faciliti el trobar les dianes que cal estudiar. En les mostres fecals, aproximadament el 3 % dels *reads* han correspost a ADN humà, fet que indica una baixa contaminació humana i una major presència de material genètic microbià. En canvi, en les mostres vaginals, aproximadament el 95 % de l'ADN seqüenciat correspon a ADN humà, fet que és coherent amb la naturalesa d'aquest tipus de mostres, on la descamació cel·lular és més abundant.

Així doncs, després de la neteja i el filtratge, partim d'un nombre aproximat d' $1,79 \times 10^6$ *reads* en les mostres fecals i un $2,05 \times 10^4$ per a les vaginals. Ambdós més que suficients per procedir amb les anàlisis posteriors.

5.3 Microbioma fecal

5.3.1 Assignació d'OTU

Durant el procés de classificació dels *reads* en les diferents OTU del microbioma fecal, s'han identificat inicialment un total de 6.177 OTU. No obstant això, s'ha dut a terme un rigorós procés de depuració. En primer lloc, s'han eliminat aquelles OTU en què només s'han classificat un *read* (*singletons*) o dos *reads* (*doubletons*), ja que és probable que siguin falsos positius derivats d'errors de seqüenciació o contaminació residual.

A continuació, s'han descartat totes aquelles OTU d'espècies que no s'han aïllat o no tenen una relació clara amb el microbioma intestinal humà, segons la literatura científica disponible. Aquest filtratge addicional garanteix que els taxons seleccionats tinguin una rellevància biològica en el context de l'intestí humà i no siguin resultat de la introducció accidental d'espècies ambientals o externes.

Finalment, després d'aquest procés de depuració, s'ha obtingut un total de 3.327 OTU que compleixen els criteris de qualitat establerts anteriorment, i que proporcionen una representació més precisa i fiable del microbioma fecal en l'estudi. Aquesta estratègia permet enfocar l'anàlisi en els taxons rellevants, eliminar soroll i augmentar la robustesa de les conclusions posteriors.

5.3.2 Estudi de la composició

En l'estudi de la composició del microbioma fecal, s'han detectat diferències en les poblacions bacterianes entre les dones control i les dones amb ITUr. El principal canvis observat és un augment significatiu en l'abundància relativa dels gèneres *Clostridium*, *Eubacterium* i *Ruminococcus* en el grup de dones amb ITUr, cosa que podria indicar una alteració de la comunitat microbiana fecal associada a l'ITUr. En canvi, en aquest mateix grup s'ha observat una disminució en l'abundància relativa dels gèneres *Parabacteroides*, *Faecalibacterium* i *Alistipes* (figura 14). Aquestes dades van d'acord amb el que van descriure Worby *et al.* en les infeccions recurrents i Nishida *et al.* en la malaltia inflamatòria intestinal, que relacionen aquests gèneres amb una bona salut intestinal (107,108).

Les espècies que pertanyen al fílum Bacteroidota, i els gèneres *Alistipes* i *Parabacteroides* s'associen a un augment d'inflamació a l'intestí, i tenen un paper com a inductors de respostes inflamatòries cròniques (109). L'augment de gèneres de microorganismes amb capacitats mucolítiques o de produir erosió a les parets de l'intestí poden contribuir a aquesta inflamació de l'intestí, com el gènere *Rumminococcus*, que s'ha trobat incrementat en les dones amb ITUr.

D'altra banda, el gènere *Faecalibacterium* és conegut com un dels principals productors d'àcids grassos de cadena curta (SCFA), metabòlits que tenen un efecte protector davant la inflamació intestinal. Els SCFA actuen modulant la resposta immunitària i mantenint la integritat de la barrera intestinal. La seva reducció pot contribuir a la disbiosi intestinal i a un estat proinflamatori que sobrecarrega el sistema immunitari (107,108).

Aquest estat d'hiperactivació immunitària pot afectar la capacitat del sistema de regular adequadament el microbioma i combatre infeccions en zones relacionades o properes a l'intestí, com el tracte urinari i vaginal (110).

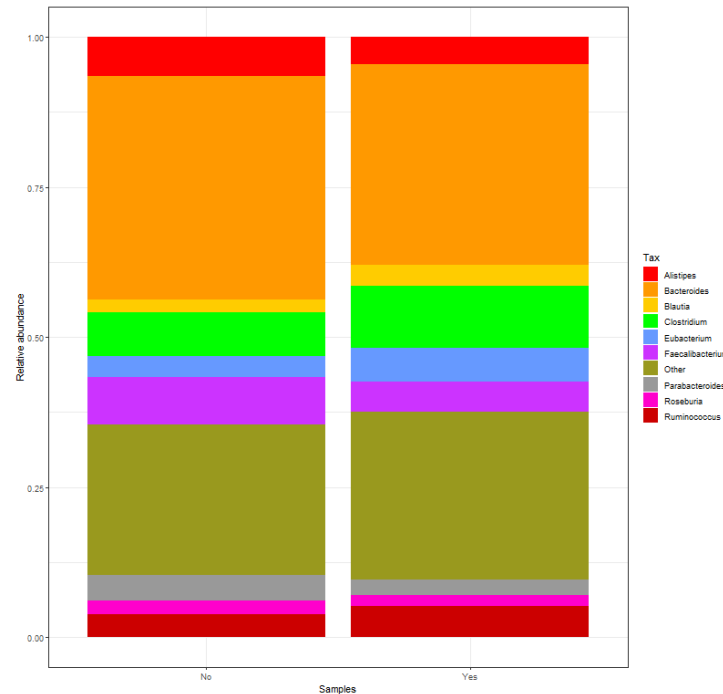


Figura 14: Agrupació dels 10 gèneres majoritaris detectats en el microbioma fecal. La resta de taxons s'han inclòs en el grup «Other». Els reads s'han normalitzat per abundàncies relatives. Les dones control a l'esquerra i les dones amb ITUr a la dreta.

5.3.3 Diversitat alfa

Per a l'estudi de la diversitat alfa de les mostres fecals, s'ha utilitzat un model lineal, el qual permet analitzar les variacions en la diversitat microbiana en funció de diferents factors. La fórmula emprada en el model es presenta de la següent manera:

$$\text{Índex de diversitat} = \text{ITUr} + \text{Edat} + \text{IMC} + \text{Menopausa}$$

En l'anàlisi de la riquesa del microbioma fecal, utilitzant l'índex Chao1, no s'ha observat cap efecte significatiu entre les dones amb ITUr i el grup de control (figura 15, Chao1). Aquest resultat indica que el nombre total d'espècies estimades en el microbioma intestinal no presenta variacions significatives entre els dos grups.

Pel que fa als índexs de diversitat estudiats, com l'índex de Shannon i l'índex de Simpson, tampoc no s'ha detectat diferències estadísticament significatives entre els grups. No obstant això, s'observa una tendència general a la baixa en la

diversitat microbiana en les dones amb ITUr en comparació amb les dones control (figura 15, Shannon i Simpson). Aquesta tendència, tot i no ser significativa, podria indicar una lleugera reducció en l'equitat i l'abundància relativa d'espècies en les mostres fecals de les dones amb ITUr.

També s'ha observat una baixa diversitat en la microbiota fecal en altres malalties, com la síndrome de l'intestí irritable o d'altres no localitzades en l'àmbit intestinal, com malalties hepàtiques i cardiovasculars (108,109). Aquesta disminució no significativa en el microbioma intestinal pot estar relacionada amb l'observació d'una lleugera disbiosi en un ambient amb unes espècies molt estables on les condicions externes, com poden ser malalties o mals hàbits (per exemple, una alimentació incorrecta), produeixen petits efectes en aquestes poblacions (50,111). El que s'observa és que la pèrdua de diversitat normalment es relaciona amb un efecte negatiu pel l'individu.

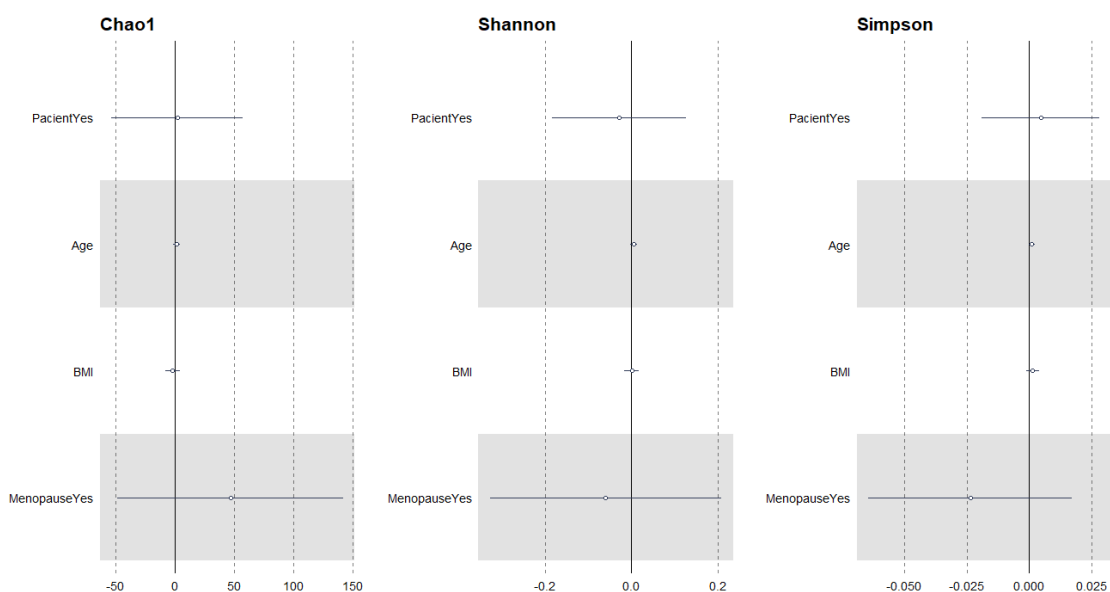


Figura 15: Efecte i desviació estàndard per a cada variable en el model de l'efecte de cada índex de diversitat alfa en cada variable en el microbioma intestinal. S'ha generat el mateix model s'ha per a l'índex de diversitat Chao1 i els índex de diversitat Shannon i Simpson.

5.3.4 Diversitat beta

En l'estudi de la diversitat beta intestinal, s'ha realitzat una anàlisi doble dels components principals (dPCoA) sobre una matriu de distància de Bray-Curtis. Els resultats obtinguts mostren una major dispersió entre les mostres del grup de dones control que en les dones amb ITUr (figura 16).

Posteriorment, s'ha realitzat una anàlisi de PERMANOVA (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*) per determinar si la clusterització observada és significativa. Per dur a terme aquesta anàlisi, s'ha coajustat utilitzant la següent fórmula:

$$\text{Variació dels components} = \text{ITUr} + \text{Edat} + \text{IMC} + \text{Menopausa}$$

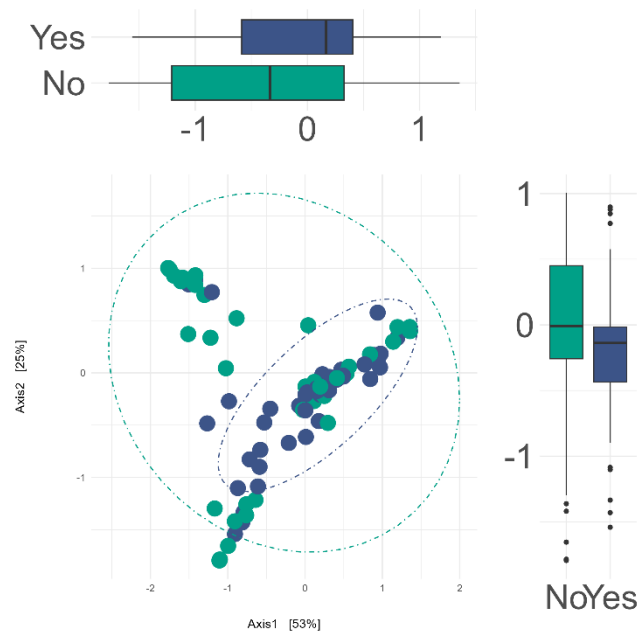


Figura 16: dPCoA de les mostres intestinals. Les dones control es troben representades en verd i les ITUr en blau. Cada punt en el gràfic representa la posició de cada mostra en el dPCoA segons els dos primers components. En els diagrames de caixa, veiem la variació dels dos primers components.

En l'anàlisi de PERMANOVA s'observa que la clusterització detectada en la dPCoA és significativa ($p = 0,00098$). Aquest efecte és molt lleuger, degut al fet que l'R del model és de 0,026. Després, s'ha realitzat una prova de PERMDISP, que ha resultat no significativa ($p = 0,12$). Això indica que aquesta clusterització significativa de les dones amb ITUr no està causada per una dispersió de les dades. En conclusió, aquesta clusterització mostra una disbiosi de la microbiota intestinal en el grup de les dones amb ITUr.

En la població general (45) s'observa una gran varietat de tipus de microbioma fecal, els quals no tendeixen a clusteritzar en les anàlisis realitzades. Aquests canvis en el microbioma poden ser causats per diversos factors, incloent-hi alteracions en la dieta que afecten la riquesa i la diversitat de les espècies

presentes. En les ITUr hi ha un efecte en les poblacions microbianes i sembla que aquest efecte es comú a totes les dones. Malauradament, no es poden treure conclusions detallades d'aquesta observació (112).

5.3.5 Anàlisi diferencial

Per a l'anàlisi diferencial dels taxons entre les dones control i les dones amb ITUr s'ha realitzat el següent model a nivell de família, gènere i espècie:

$$LFC \text{ per a cada taxò} = ITUr + Edat + IMC + Menopausa$$

- $LFC = \text{Variació logarítmica}$

A nivell de família, s'han detectat 53 taxons significatius, dels quals només 20 i 4 segueixen sent significatius després de la prova de correcció del valor de p per BH i Bonferroni, respectivament. Les famílies més observades en les dones amb ITUr han sigut *Methylococcaceae*, *Pseudeurotiaceae*, *Pichiaceae* i *Streptococcaceae*. En canvi, a les dones control s'han observat *Odoribacteriaceae*, *Sutterellaceae* i *Succinivibraceae* (figura 17).

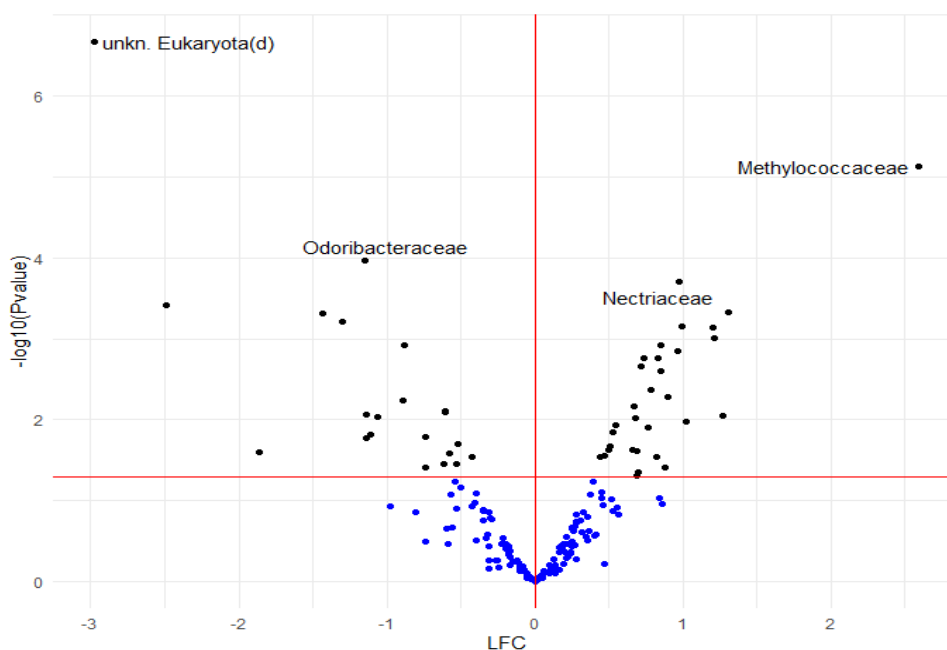


Figura 17A: Anàlisi diferencial de les famílies de microorganismes detectades en el microbioma intestinal. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per Bonferroni tenen el nom inclòs en el gràfic.

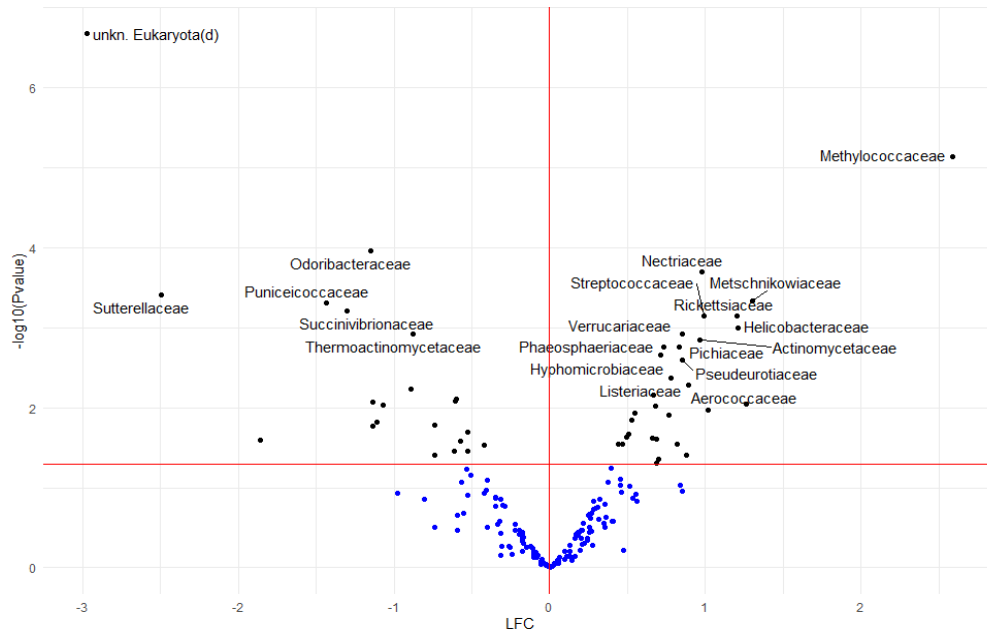


Figura 17B: Anàlisi diferencial de les famílies de microorganismes detectades en el microbioma intestinal. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p , per BH tenen el nom inclòs en el gràfic.

A nivell de gènere, s'han trobat 171 taxons significatius, que corregits per mètodes de correcció del valor de p , són 96 per BH i 19 per Bonferroni. Els gèneres més detectats en dones amb ITUr són *Aspergillus*, *Weissella* i *Assaccharospora*. Per contra, els gèneres *Blastocystis*, *Prevotellamassilia* i *Holdemania* s'han trobat augmentats en les dones control (figura 18).

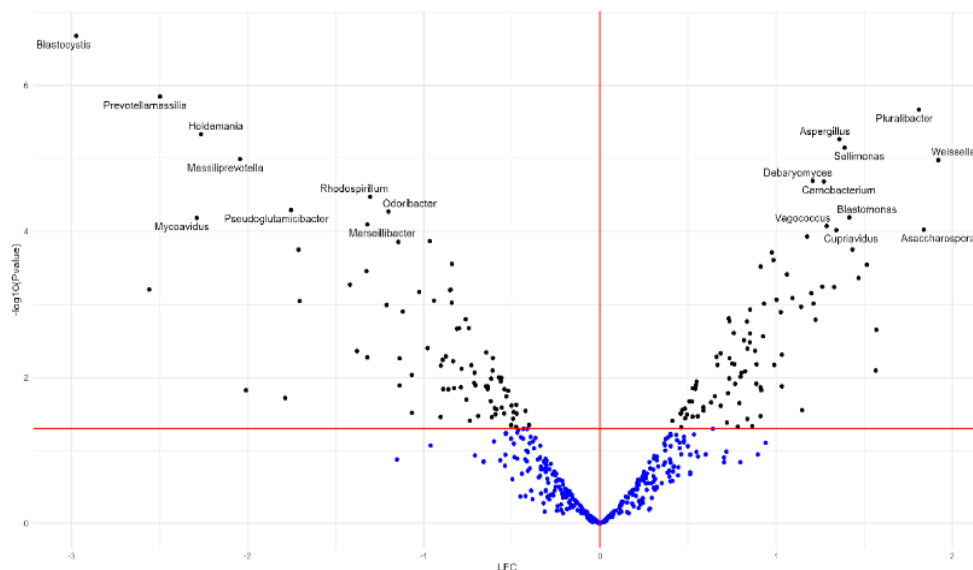


Figura 18A: Anàlisi diferencial dels gèneres de microorganismes detectats en el microbioma intestinal. Els punts de color negre són els taxons significatius. A l'esquerra, els taxons amb una abundància major en les dones control. A la dreta, els més observats en les ITUr. Els que són positius per la correcció del valor de p per Bonferroni tenen el nom inclòs en el gràfic.

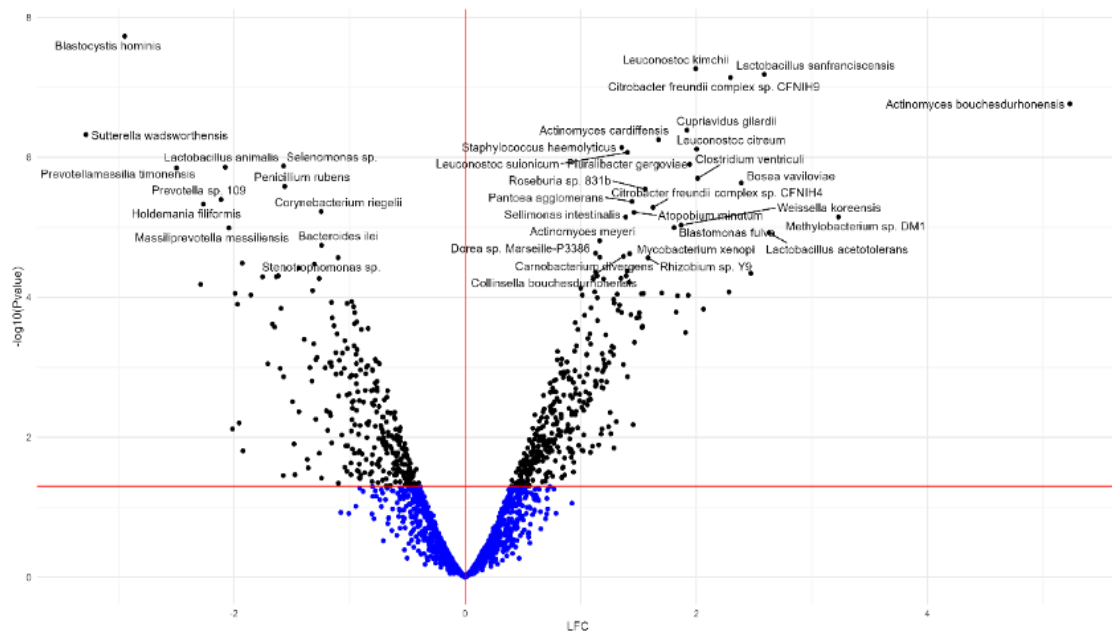


Figura 19B: Anàlisi diferencial de les espècies microorganismes detectades en el microbioma intestinal. A l'esquerra, els taxons amb una abundància major en les dones control. A la dreta, els més observats en les ITUr. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per BH tenen el nom inclòs en el gràfic.

control es troben augmentats *Blastocystis hominis*, *Sutterella wadsworthensis* i *Lactobacillus animalis* (figura 19).

En l'anàlisi diferencial s'ha detectat l'increment de taxons que corresponen a uropatògens en el microbioma intestinal de les dones que pateixen recurrències. Les espècies d'uropatògens que s'han trobat incrementades en les dones amb ITUr han sigut espècies de *Citrobacter*, *Enterobacter bugadensis* i *Staphylococcus haemolyticus*, o la família *Pichiaceae* (que inclou fongs com les càndides). L'augment d'aquest microorganisme pot afavorir el nombre d'intents d'invasió del microbioma urinari per part del microbioma intestinal, la qual cosa pot produir un increment de proliferacions i, per tant, del risc d'ITUr (1).

Altres taxons que s'han detectat incrementats en el microbioma intestinal en el grup de control han sigut *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Tot i que són taxons que normalment es troben associats a un estat sa de la microbiota intestinal, s'han trobat incrementats en les dones amb ITUr. En estudis d'ITU, s'ha observat l'increment d'aquests gèneres en el microbioma intestinal degut a una major interacció amb la microbiota vaginal (113), la qual cosa denota una relació més estreta entre els dos microbiomes en les dones amb ITUr que en les dones control (114).

Alguns dels taxons detectats en les dones control han sigut algunes espècies de la família *Prevotellamassilia* o del gènere *Weisella* relacionats amb la producció d'SCFA. Aquests àcids tenen la funció de reduir la inflamació intestinal, de manera que no es generi un estat d'inflamació crònica, amb la qual cosa s'allibera la càrrega del sistema immunitari de l'intestí (54,110). També s'han detectat els gèneres *Odoribacter* i *Holdemania*. Tot i que no es coneix la implicació d'aquests dos gèneres en el microbioma, s'ha observat que el seu increment es correlaciona amb condicions de microbiota sana (115). En les dones control s'ha detectat l'augment d'un paràsit, *Blastocystis*. Tot i que antigament aquest paràsit es considerava patògen primari, en estudis recents s'ha posat en dubte la seva patogenicitat en la població sana i s'ha suggerit que podria ser un marcador de bona microbiota que permetria mantenir la diversitat a l'intestí i l'existència d'una microbiota sana (116).

5.3.6 Anàlisi de biomarcadors

En l'anàlisi de biomarcadors, s'ha dut a terme una anàlisi discriminant amb l'objectiu d'identificar quins microorganismes podrien servir com a potencials biomarcadors per caracteritzar el microbioma. Aquesta metodologia permet diferenciar les comunitats microbianes entre els dos grups d'estudi (dones amb infecció del tracte urinari recurrent i dones control) mitjançant la identificació de patrons distintius en la seva composició.

El model aplicat per detectar els microorganismes diferencials entre els grups s'ha estructurat de la següent manera:

$$\text{Biomarcador} = ITUr + Edat + IMC + Menopausa$$

En el microbioma intestinal de les dones amb infecció del tracte urinari recurrent, els gèneres més representats han estat *Gramella*, *Streptococcus* i *Bibersteinia*. Per contra, a les dones sanes del grup de control, els gèneres predominants han sigut *Leptothrix*, *Holdemanina* i *Cardiobacterium* (figura 20A).

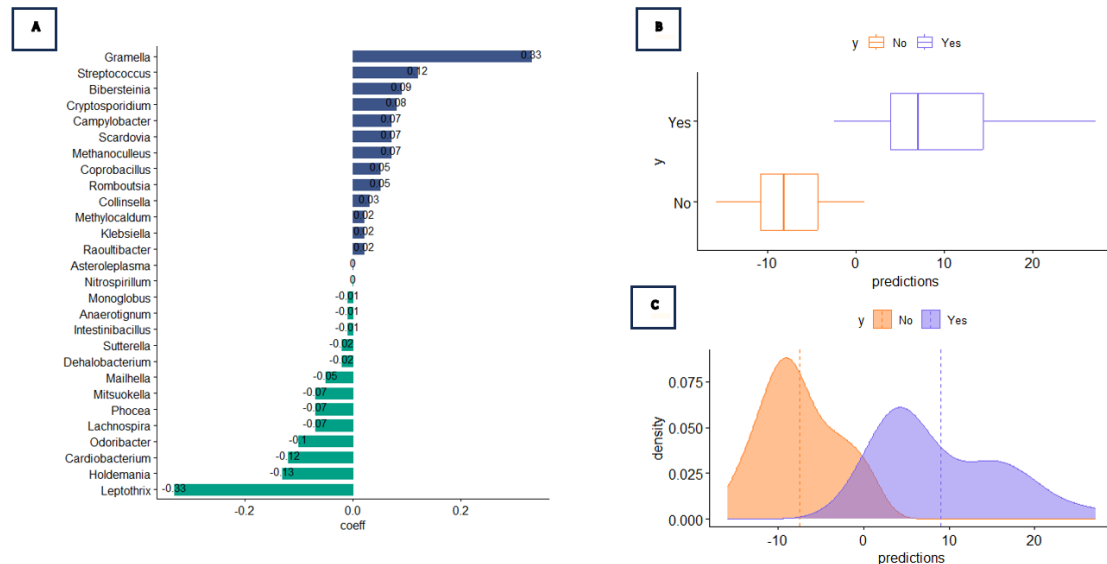


Figura 20: Resultats de l'anàlisi discriminant amb el paquet Coda4microbiome del microbioma intestinal. A) El nombre i nom dels taxons utilitzats per realitzar l'anàlisi discriminant amb un valor més alt són aquells que tenen una importància major a l'hora de determinar el grup. B) Classificació de les mostres si utilitzem els taxons retrobats en la primera part de l'anàlisi, tenint en compte el pes del taxó i la seva abundància relativa. C) Distribució de les mostres i nombre aproximat d'aquestes segons el factor pronòstic.

A continuació, s'han utilitzat aquests microorganismes per avaluar la seva capacitat de separar les mostres dels dos grups. Els resultats mostren que, en general, els gèneres identificats permeten una clara diferenciació de la procedència de les mostres; tanmateix, s'ha detectat que 5 mostres presenten un valor confús, la qual cosa dificulta la seva classificació (figures 20B i 20C).

Aquests resultats dispersos i de difícil classificació podrien indicar variabilitat en la composició de les mostres, que pot ser deguda a altres factors com la dieta, l'estat de salut o la variabilitat biològica individual. La identificació d'aquests gèneres clau no només contribueix a la caracterització del microbioma intestinal en el context de les ITUr, sinó que també pot ser una nova aproximació a biomarcadors en el futur.

5.4 Microbioma vaginal

5.4.1 Assignació d'OTU

En la assignació taxonòmica dels *reads* en el microbioma vaginal, s'ha identificat un total de 3.496 OTU. També s'ha dut a terme un procés de depuració per descartar possibles falsos positius. Aquest procés ha consistit en eliminar el *singletons* i *doubletons*, així com tots aquells que no s'han descrit en el microbioma vaginal. Com a resultat d'aquesta de la eliminació de taxons, el nombre total d'OTU s'ha reduït a 1.669.

5.4.2 Anàlisi de la composició

En l'anàlisi de la composició dels 10 gèneres més representats del microbioma vaginal, s'ha observat que en les dones amb ITUr hi ha una disminució significativa de la població predominant del gènere *Lactobacillus*. Aquesta disminució s'associa amb un augment dels gèneres *Achromobacter*, *Stenotrophomonas* i *Prevotella* (figura 21).

En el grup de dones control, el gènere *Lactobacillus* és predominant, la qual cosa contribueix a mantenir l'homeòstasi del microbioma vaginal mitjançant la regulació d'un pH àcid a partir de la fermentació làctica (117,118). En canvi, a les dones amb ITUr s'observen altres gèneres que s'han relacionat amb disbiosi vaginal, els quals desplacen els *Lactobacillus*, provocant un augment del pH i permetent la proliferació d'altres espècies microbianes. Això explica l'increment d'espècies que no es troben entre les deu més importants en aquest grup (119). S'ha observat un increment dels gèneres *Prevotella* i *Stenotrophomonas*, que són típicament presents en el microbioma intestinal, la qual cosa denota una connexió més gran entre les microbiotes vaginal i intestinal. D'altra banda, el gènere *Achromobacter*, identificat com un dels principals actors en l'augment del pH, s'ha trobat associat en l'estudi del microbioma vaginal amb altres patologies a nivell vaginal com la vulvodínia, on s'observa també un increment de *Gardnerella* (120).

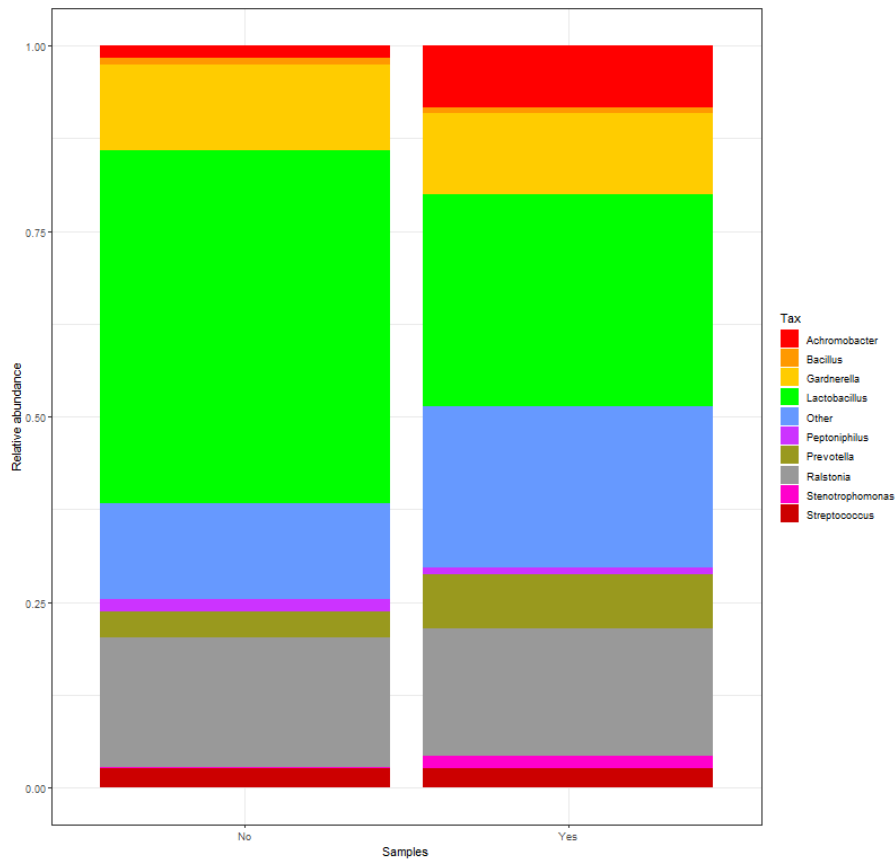


Figura 21: Agrupació dels 10 gèneres majoritaris detectats en el microbioma vaginal. La resta de taxons s'han inclòs en el grup «Other». Els reads s'han normalitzat per abundàncies relatives. Les dones control a l'esquerra i les dones amb ITUr a la dreta.

5.4.3 Diversitat alfa

Per a l'estudi de la diversitat alfa de les mostres vaginals s'ha realitzat un model lineal amb la següent equació de la fórmula en el model:

$$\text{Índex de diversitat} = \text{ITUr} + \text{Edat} + \text{IMC} + \text{Menopausa}$$

En l'estudi de la riquesa del microbioma vaginal, no s'ha observat cap efecte significatiu en les dones amb infecció del tracte urinari recurrent (figura 22, Chao1). No obstant això, en els índexs de diversitat analitzats, com els de Shannon i Simpson, s'ha registrat una diferència significativa en el model. Concretament, les dones amb ITUr presenten un augment en els índexs de diversitat (figura 22, Shannon i Simpson).

Altres estudis han reportat la importància d'una microbiota amb una composició predominada pel gènere *Lactobacillus*, i com el desplaçament d'aquesta pot arribar a provocar molèsties o problemes en la salut de la dona (117,118). Tal com s'observa en l'estudi, en les dones amb ITUr es produeix una gran disminució del gènere *Lactobacillus*, que perd la predominança, i això s'observa també a nivell de diversitat alfa, on veiem l'increment dels índex de Shannon e Simpson en el microbioma vaginal. En les dones menopàusiques, s'ha vist un increment significatiu de la diversitat alfa del microbioma vaginal degut a la pèrdua del gènere *Lactobacillus*. Aquesta pèrdua de diversitat alfa s'ha correlacionat amb algunes malalties en certes publicacions (47,121). Tot i que en les dones del nostre estudi tenen diferències significatives en l'estat menopàusic entre dones amb ITUr i dones control, pot ser que la menopausa participi com a factor de risc d'ITUr degut al desplaçament que es provoca en la microbiota vaginal (121,122).

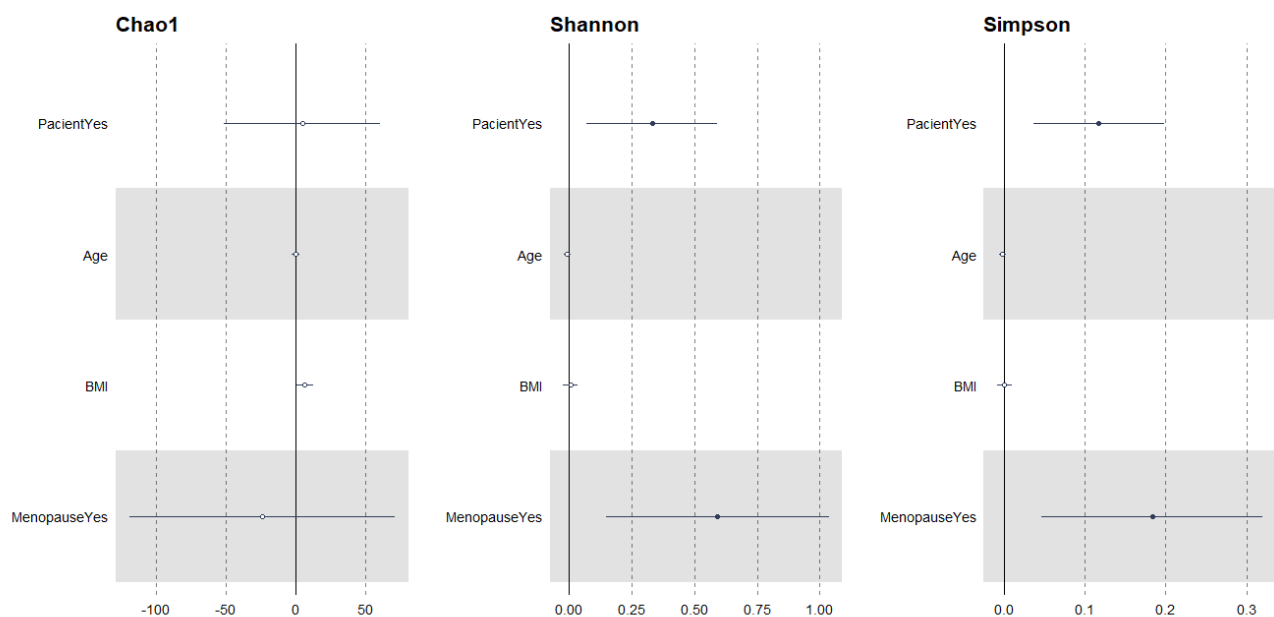


Figura 22: Efecte i desviació estàndard per a cada variable en el model de l'efecte de cada índex de diversitat alfa en cada variable en el microbioma vaginal. El mateix model s'ha generat per a l'índex de diversitat Chao1 i els índex de diversitat Shannon i Simpson.

5.4.4 Diversitat beta

En l'estudi de la diversitat beta vaginal en la dPCoA s'observa una major dispersió en les mostres en les dones amb ITUr que en les dones control, per tant observem que les mostres de les dones amb ITUr no tenen una microbiota comuna entre elles. La microbiota vaginal de les dones control és capaç de clusteritzar (figura 23). En l'ANOVA de la diversitat beta s'ha utilitzat la següent fórmula per fer el coajustament:

$$\text{Distància al centre} = \text{ITUr} + \text{Edat} + \text{IMC} + \text{Menopausa}$$

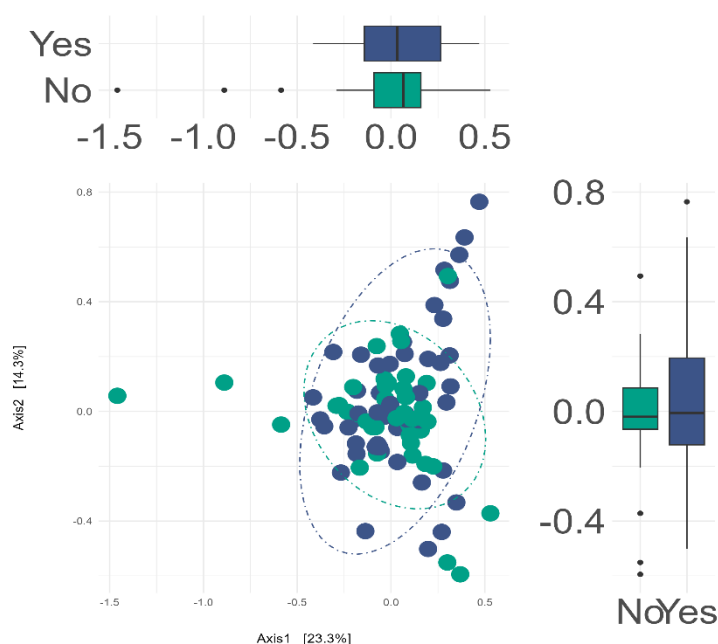


Figura 23: dPCoA de les mostres vaginals. Les dones control es troben representades en verd i les que tenen ITUr en blau. Cada punt en el gràfic representa la posició de cada mostra en el dPCoA segons els dos primers components. En els diagrames de caixa veiem la variació dels dos primers components.

En el test d'ANOVA observem que l'efecte de dispersió que observem en la dPCoA és significatiu ($p = 0,0001$) i amb el PERMDISP s'ha valorat que no hi ha dispersió ($p = 0,09$). S'observa com hi ha clarament una pèrdua de la població predominant en les dones amb ITUr. Això s'observa per la major dispersió en les mostres de les pacients que en de les dones control, que són més semblants (118,119).

5.4.5 Anàlisi diferencial

Per a l'estudi dels taxons diferencials en el microbioma vaginal, s'ha aplicat un model lineal generalitzat per a cada nivell taxonòmic estudiat: família, gènere i

espècie. El model utilitzat per identificar les diferències en l'abundància relativa dels taxons entre els grups (dones amb ITUr i dones control) és el següent:

$$LFC \text{ per cada taxò} = ITUr + Edat + IMC + Menopausa$$

* LFC = Variació logarítmica

A nivell de família, s'han detectat 33 taxons inicialment significatius, que s'han reduït a 25 i 12 després de la correcció del valor de p per BH i Bonferroni, respectivament. En el grup amb ITUr, les famílies més representades han sigut *Xanthomonadaceae*, *Caulobacteraceae* i *Alcaligenaceae*, i en les control, *Synergistaceae*, *Rhizobiaceae*, *Selenomonadaceae* (figura 24).

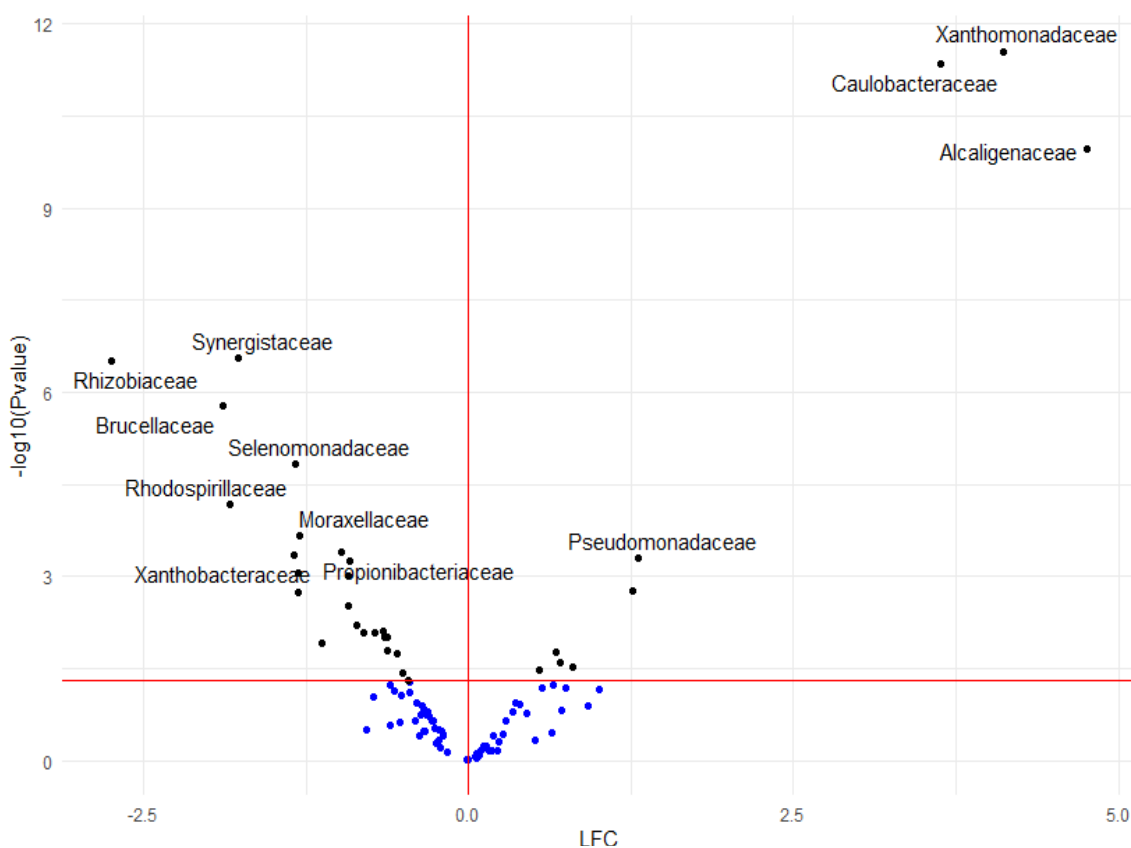


Figura 24A: Anàlisi diferencial de les famílies de microorganismes detectades en el microbioma vaginal. A l'esquerra, els taxons amb una abundància major en les dones control. A la dreta, els més observats en les ITUr. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per Bonferroni tenen el nom inclòs en el gràfic.

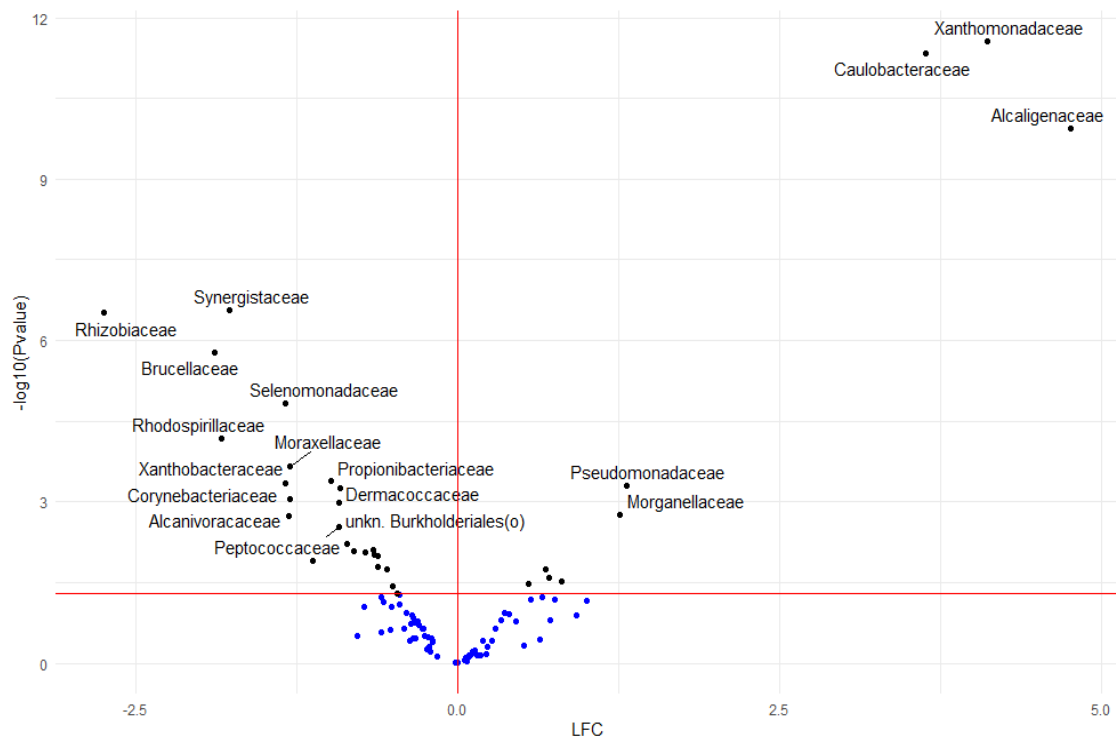


Figura 24B: Anàlisi diferencial de les famílies de microorganismes detectades en el microbioma vaginal. A l'esquerra, els taxons amb una abundància major en les dones control. A la dreta, els més observats en les ITUr. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per BH tenen el nom inclòs en el gràfic.

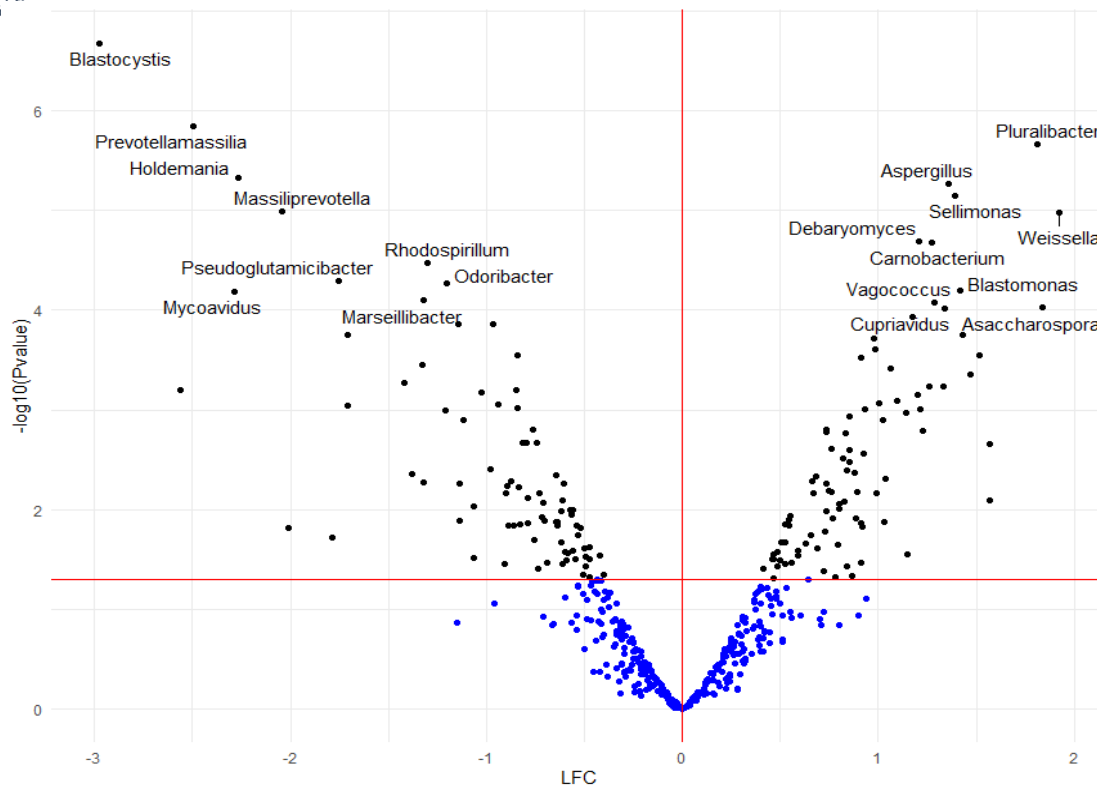


Figura 25A: Anàlisi diferencial dels gèneres de microorganismes detectats en el microbioma vaginal. A l'esquerra, els taxons amb una abundància major en les dones control. A la dreta, els més observats en les ITUr. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per Bonferroni tenen el nom inclòs en el gràfic.

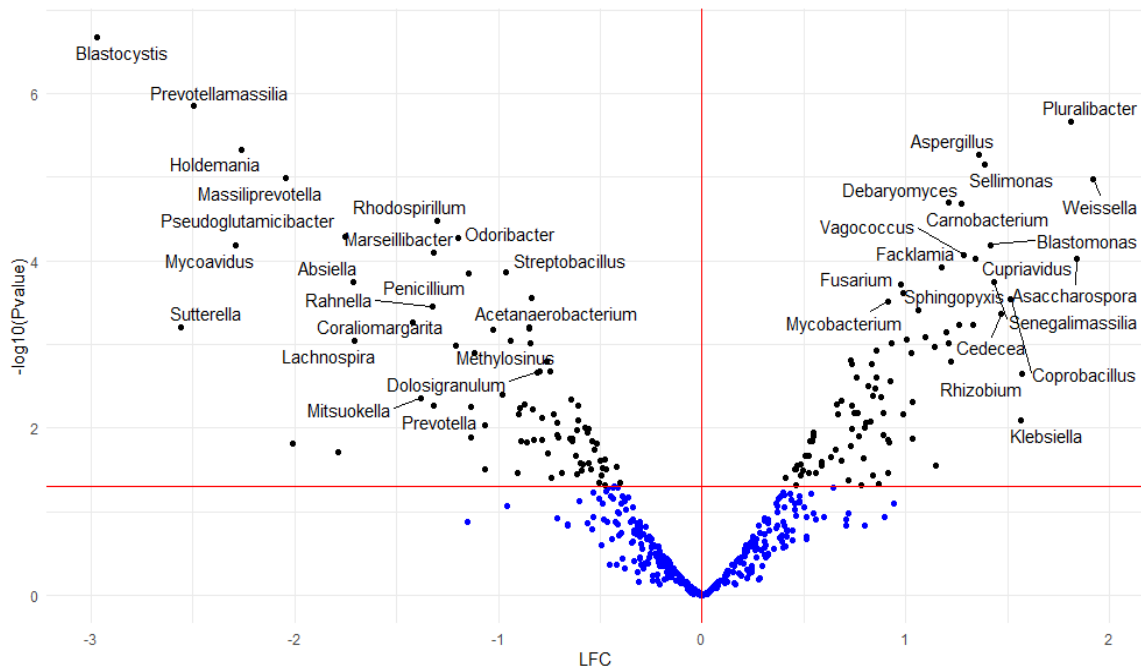


Figura 25B: Anàlisi diferencial dels gèneres de microorganismes detectats en el microbioma vaginal. A l'esquerra, els taxons amb una abundància major en les dones control. A la dreta, els més observats en les ITUr. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per BH tenen el nom inclòs en el gràfic.

A nivell de gènere, s'han trobat 78 taxons significatius, que corregits per mètodes de correcció del valor de p són 59 per BH i 17 per Bonferroni. Els gèneres més detectats en dones amb ITUr són *Achromobacter*, *Stenotrophomonas* i *Brevundimonas*. Per contra, els gèneres *Agrobacterium*, *Rhizobium* i *Ochrobactrum*, entre d'altres, s'han trobat disminuïts (figura 25).

A nivell d'espècie, s'han trobat 290 taxons significatius, els quals, un cop aplicats els tests de BH i Bonferroni, s'han reduït a 219 i 47, respectivament. Entre les espècies més detectades en les dones amb ITUr trobem algunes espècies d'*Streptococcus* del grup B, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*, i una espècie de *Lactobacillus*, *L. Paracasei*. Per contra, en les dones control trobem augmentades algunes espècies de *Lactobacillus*, *Streptococcus respiraculi* i *Chryseobacterium hominis* (figura 26).

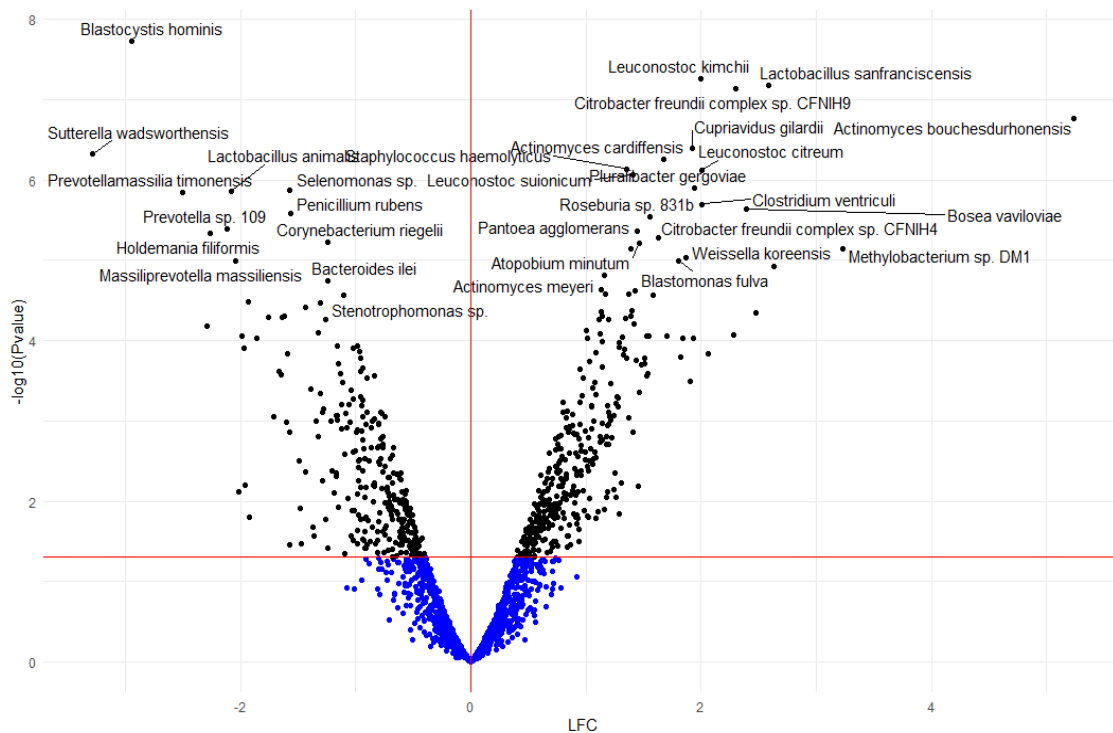


Figura 26A: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma vaginal. A l'esquerra, els taxons amb una abundància major en les dones control. A la dreta, els més observats en les ITUr. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p, a l'esquerra per Bonferroni, a la dreta per BH, tenen el nom inclòs en el gràfic.

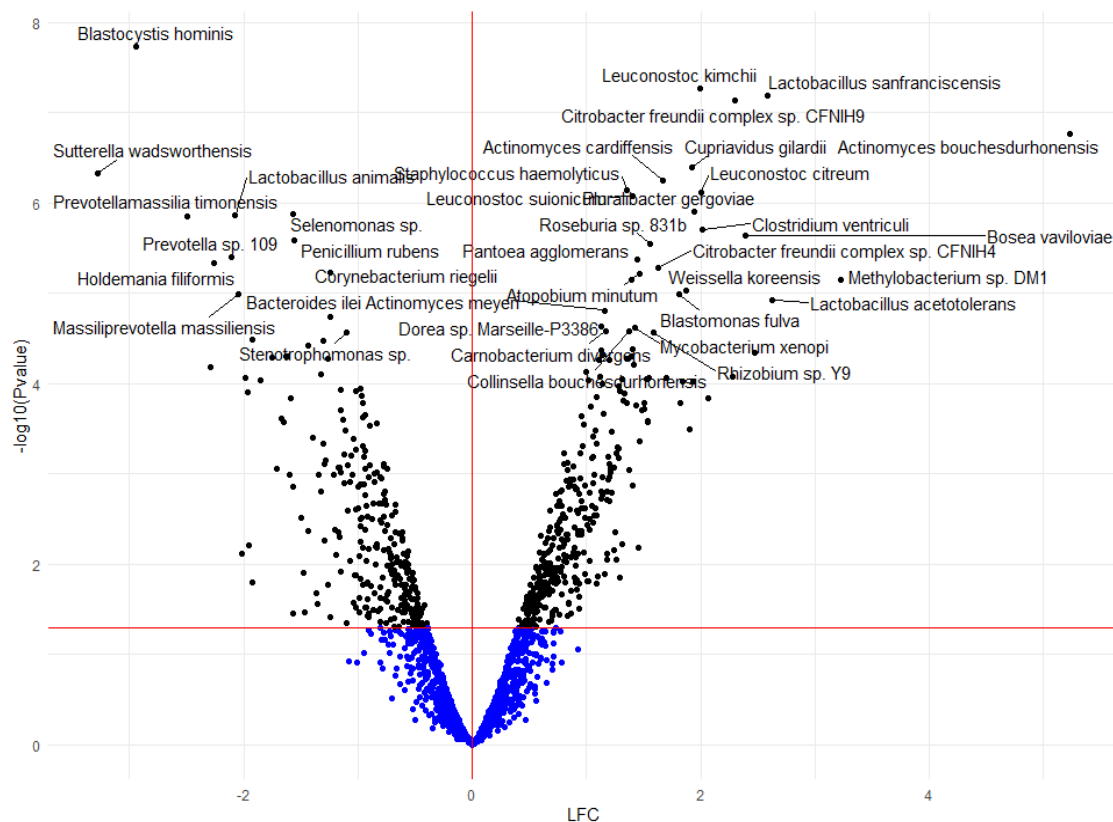


Figura 26B: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma vaginal. A l'esquerra, els taxons amb una abundància major en les dones control, a la dreta més observats en les ITUr. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p, a l'esquerra per BH, a la dreta per BH, tenen el nom inclòs en el gràfic.

En el grup de les dones amb ITUr, el principal gènere de l'espècie *Lactobacillus* que s'observa és *L. paracasei*. Entre les espècies, s'ha observat que *L. paracasei* s'ha establert com a un bon microorganisme per a la recuperació de la microbiota intestinal o vaginal, i fins i tot se n'estudia l'administració oral (123). És possible que *L. paracasei* es trobi disminuït en les persones sense ITUr per raons com que el pH que generi no sigui tan àcid, la qual cosa facilitaria l'augment de recurrències (124).

En l'anàlisi a nivell de gènere, no s'observa una reducció significativa del gènere *Lactobacillus* en les dones amb ITUr quan anàlitzem la significació i corregim per testatge múltiple, tant de BH com de Bonferroni. La disminució que sí ha sigut significativa després de la correcció ha sigut la d'altres gèneres de BAL, com ara *Streptococcus* en les dones amb ITUr, que contribueixen a la disminució del pH a més dels *Lactobacillus* (119). Per altra banda, s'ha observat un augment de famílies com *Alcaligenaceae*, de la qual *Achromobacter* és el principal gènere augmentat. Aquests produeixen l'efecte contrari, és a dir, augmenten el pH, i també s'han trobat en infeccions urinàries per catèter o en la vulvodínia (120,125).

En aquest estudi hem observat com alguns uropatògens es troben augmentats en les dones amb ITUr, com poden ser *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* o *Stenotrophomonas maltophilia*. Això podria ser per dues raons, bé que el microbioma vaginal actua com a reservori d'aquests microorganismes, o bé que hi ha una facilitat per als microorganismes de la microbiota intestinal d'arribar a la microbiota vaginal (10,65,125). En ambdues situacions, això es tradueix en una facilitat per augmentar el nombre d'intents per colonitzar la uretra i produir una ITUr, la qual cosa genera un increment d'infeccions i proliferacions, que poden desembocar en l'establiment i desenvolupament d'ITUr en les dones(8).

5.4.6 Anàlisi de biomarcadors

En l'anàlisi de biomarcadors, s'han trobat possibles microorganismes candidats que podrien ser marcadors per poder diferenciar els dos grups de l'estudi, per tant, possibles gèneres marcadors d'ITUr. Els gèneres més representatius en el microbioma vaginal de les dones amb ITUr han sigut *Bordetella*, *Brevundimonas* i *Stenotrophomonas*. Per contra, *Acidovorax*, *Sphingomonas* i *Xanthomonas* han sigut els més representatius en les dones control (figura 27A). Després, s'ha observat la puntuació de les abundàncies d'aquests microorganismes i s'ha observat com aconsegueixen separar les mostres. Així, trobem que només 6 mostres serien classificades erròniament degut a un valor més abundant a l'altre grup (figura 27B i 27C).

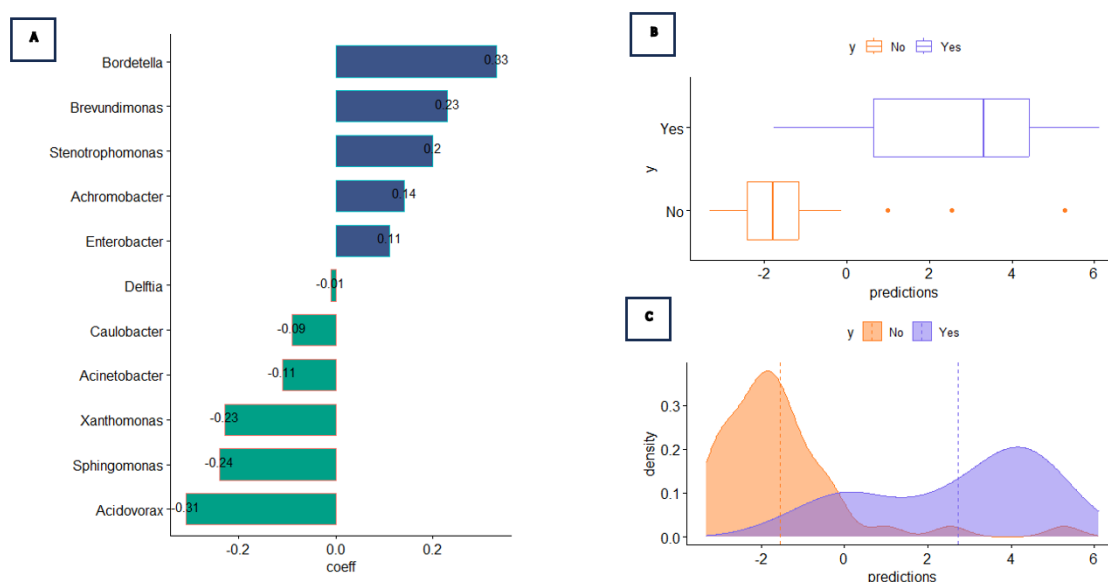


Figura 27: Resultats de l'anàlisi discriminant amb el paquet Coda4microbiome del microbioma vaginal. A) El nombre i nom dels taxons utilitzats per realitzar l'anàlisi discriminant. Els que tenen un valor més alt són els que tenen una importància major a l'hora de determinar el grup. B) Classificació de les mostres si utilitzem els taxons trobats en la primera part de l'anàlisi, tenint en compte el pes del taxó i la seva abundància relativa. C) Distribució de les mostres i nombre aproximat d'aquestes segons el factor pronòstic.

L'anàlisi discriminant ha revelat que sí que existeix la possibilitat d'utilitzar gèneres com a marcadors de les dones amb ITUr. S'ha observat augment dels gèneres *Stenotrophomonas* i *Brevundimonas* en processos que produeixen una alteració de la microbiota, com ara la neoplàsia intraepitelial cervical (126). Tot i que en els nostres estudis s'ha detectat la presència d'*Acidovorax* en dones control, hi ha un estudi en què se'n determina la relació amb la infecció pel virus del papil·loma humà (HPV), la qual cosa ens indica la necessitat d'un nombre de

mostres més elevat per poder fer servir aquests taxons com a marcadors i establir un marcadors més específics d'ITUr (127).

5.5 Eix intestí-vagina

Per comprendre millor la relació entre la microbiota intestinal i la vaginal en el context de les infeccions del tracte urinari recurrent, s'ha realitzat una anàlisi de la distància mitjana entre les mostres vaginals i fecals (0,998 i 0,995) de la mateixa participant. Aquest mètode, basat en l'anàlisi de la diversitat beta entre microbiomes, permet avaluar la semblança o diferència entre els microbiomes de diferents ubicacions corporals dins d'una mateixa persona.

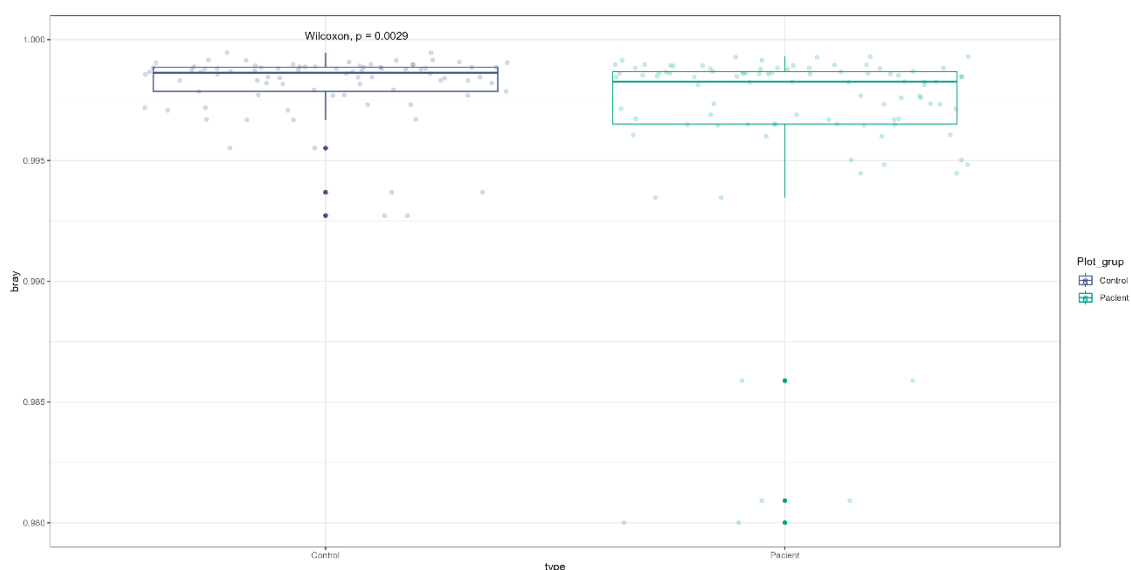


Figura 28: Representació de la distància entre el microbioma intestinal i el vaginal de cada participant de l'estudi, desglossat per dones control (blau) i amb ITUr (verd). El test de significació utilitzat ha sigut el test de Wilcoxon.

En l'anàlisi de la distància mitjana entre les dones control i les dones amb ITUr, s'ha observat que la distància entre les microbiotes vaginal i intestinal és significativament superior en les dones control (0,998) que en les dones amb ITUr (0,992) ($p = 0,0029$) (figura 28).

S'observa que la diferència entre les microbiotes intestinals i vaginals en les dones amb ITUr són menors que en les dones control. Això és degut al fet que comparteixen un major nombre d'espècies, i que hi ha una major comunicació de microorganismes entre els dos ambients. Aquesta relació més estreta s'apropa a la idea que les ITU es produeixen perquè microorganismes de l'intestí són capaços d'establir-se a la microbiota vaginal i arribar a la bufeta. Aquesta

relació més estreta, donarà un nombre major de colonitzacions i, consegüentment, un nombre major d'ITU (8,107).

5.6 Efecte de les relacions postcoitals en el microbioma de dones amb ITUr

A l'estudi s'ha dut a terme una anàlisi addicional en què s'han agrupat les dones que pateixen infeccions del tracte urinari recurrent en dos grups diferenciats.

- Aquelles dones que pateixen ITUr pràcticament sempre poc després de les relacions sexuals (29 dones amb ITUr).
- Aquelles dones que pateixen ITUr i en les quals no existeix aquesta relació cronopatològica amb les relacions sexuals (21 dones amb ITUr).

L'objectiu d'aquesta anàlisi ha estat identificar si existeixen variacions significatives entre els dos grups, segons si l'aparició de les ITUr està relacionada amb les relacions sexuals o no.

5.6.1 Anàlisis de la composició

En l'estudi de la composició del microbioma intestinal de les mostres fecals, no s'han observat diferències significatives entre les dones amb ITUr relacionades amb el coit i el grup de dones amb ITUr no relacionades amb el coit. No obstant això, s'ha detectat un augment notable del gènere *Clostridium* en les dones amb ITUr no postcoitals (figura 29). Aquest gènere ha estat prèviament associat amb disbiosi en diverses condicions patològiques, inclosos pacients amb insuficiència renal, en els quals aquest gènere es troba incrementat en el microbioma intestinal. Aquesta observació indica una possible relació entre la presència elevada de *Clostridium* i una disfunció en l'aparell urinari, tot i que la connexió exacta entre aquest gènere i les infeccions urinàries recurrents no postcoitals requereix una investigació més profunda (128).

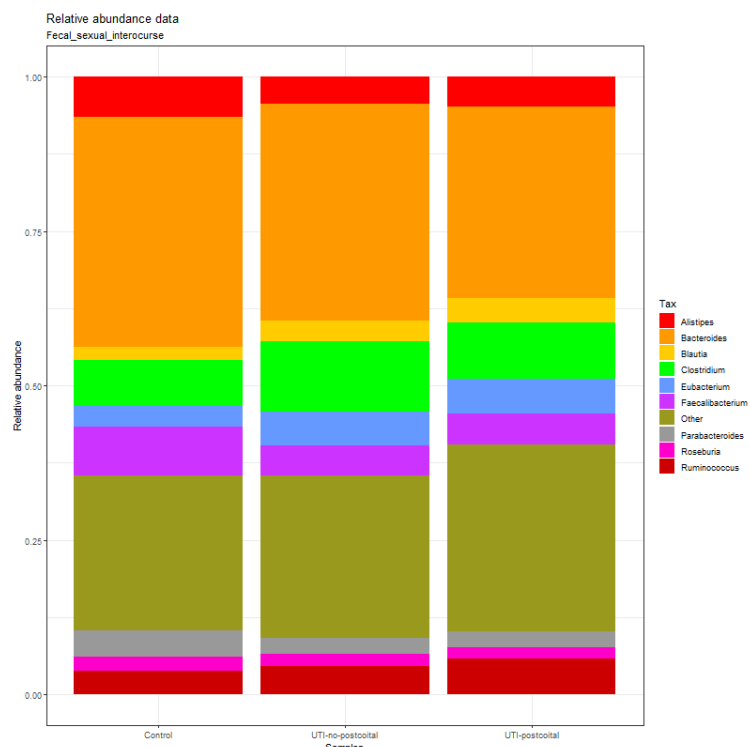


Figura 29: Agrupació dels 10 generes majoritaris detectats en el microbioma vaginal. La resta de taxons s'han inclòs en el grup «Other». Els reads s'han normalitzat per abundàncies relatives. Les dones control a l'esquerra, les dones amb ITUr no postcoital al centre i les dones amb ITUr postcoital a la dreta.

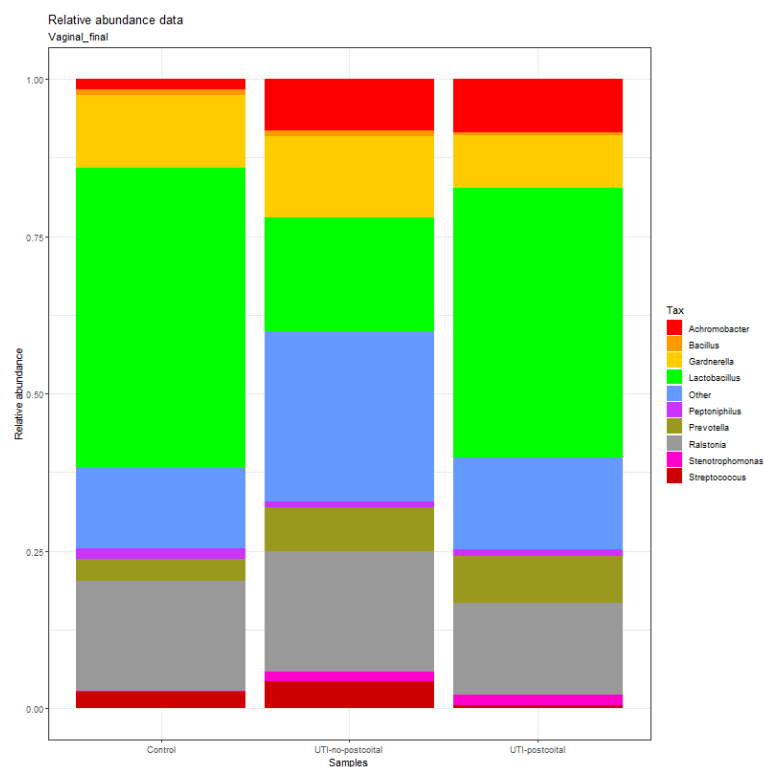


Figura 30: Agrupació dels 10 generes majoritaris detectats en el microbioma vaginal. La resta de taxons s'han inclòs en el grup «Other». Els reads s'han normalitzat per abundàncies relatives. Les dones control a l'esquerra, les dones amb ITUr no postcoital al centre i les dones amb ITU postcoital a la dreta.

En l'estudi de la composició de les mostres vaginals, s'observa una diferència significativa entre els dos subgrups de dones amb infeccions del tracte urinari recurrent (dones amb ITUr). Les dones amb ITUr no postcoital presenten una disminució del gènere *Lactobacillus* i un increment del gènere *Gardnerella* en comparació amb les dones amb ITUr postcoital (figura 30).

El gènere *Lactobacillus* té un paper crucial en el manteniment de l'homeòstasi del microbioma vaginal, ja que és responsable de mantenir un pH baix gràcies a la producció d'àcid làctic. Aquesta acidesa crea un entorn protector que impedeix el creixement de patògens, inclosos els associats a infeccions del tracte urinari (ITUr).

L'augment de *Gardnerella*, per la seva banda, ha estat àmpliament associat a la vaginosi bacteriana, afecció caracteritzada per la pèrdua de *Lactobacillus* i l'augment del pH vaginal. Aquesta alteració en la composició microbiana fa que el microbioma vaginal es torni més propens a facilitar infeccions, incloent-hi les ITUr. Els resultats d'aquest estudi indiquen que les dones amb ITUr no postcoital podrien experimentar un patró de disbiosi similar al que s'observa en la vaginosi, fet que les fa més susceptibles a noves infeccions (119). Tot i això, no podem definir si aquesta disbiosi n'és la causa o una conseqüència.

5.6.2 Diversitat alfa

En l'anàlisi de la diversitat alfa, s'ha aplicat un model lineal generalitzat basat en la següent fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Índex de diversitat} \\ &= \text{Aparició d'ITUr després de les relacions sexuals} * + \text{Edat} \\ &+ \text{IMC} + \text{Menopausa} \end{aligned}$$

* S'ha agafat les dones control com a grup de referència en el model lineal.

S'observa en el microbioma intestinal com hi ha una tendència de disminució de la diversitat en les dones amb ITUr no postcoital, tendència que no es troba en les dones amb ITUr postcoitals. En el microbioma vaginal s'observa un augment significatiu de la riquesa només en les dones amb ITUr no postcoital i un augment de diversitat en ambdós grups (figura 31). Aquesta anàlisi indica que la causa de les recurrències en les dones amb ITUr és diferent segons el grup de pacients

analitzats. En les dones amb ITUr postcoital, observem que no hi ha un gran augment de la diversitat alfa en la microbiota intestinal, per tant el problema es troba principalment localitzat en la microbiota vaginal. Per contra, a les dones amb ITUr no postcoitals s'observa un increment en la diversitat alfa intestinal.

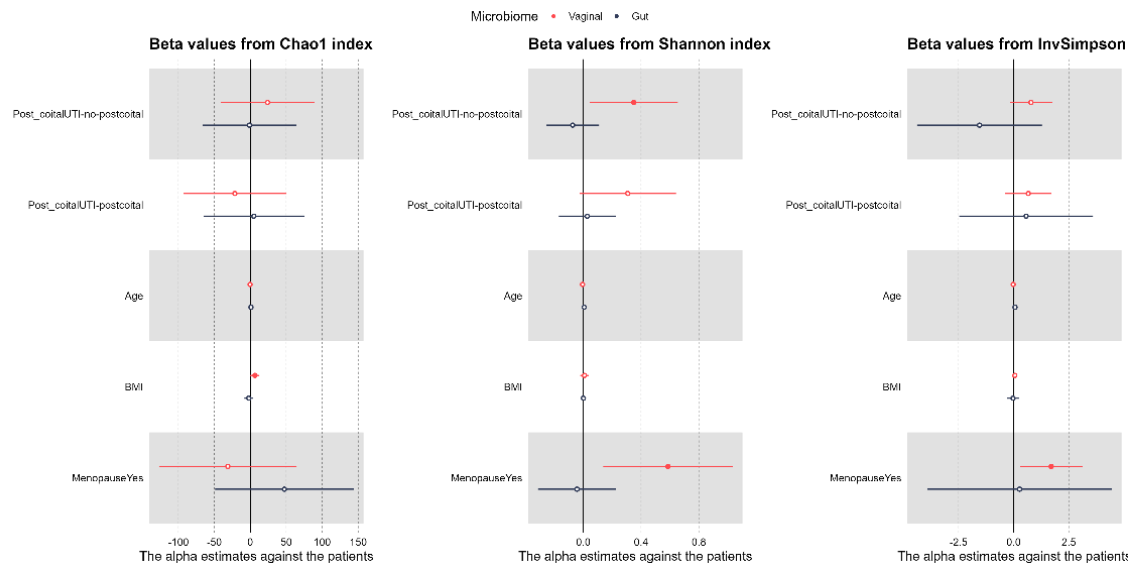


Figura 31: Efecte i desviació estàndard per a cada variable en el model de l'efecte de cada índex de diversitat alfa en cada variable en el microbioma vaginal (vermell) i intestinal (negre). S'ha generat el mateix model per a l'índex de diversitat Chao1 i els índex de diversitat Shannon i Simpson.

En el microbioma vaginal, s'observa un increment de la diversitat alfa en els índex de diversitat, més marcat en l'índex de Shannon. Aquí veiem que, independentment del grup, hi ha una tendència a l'alça en la diversitat vaginal, per tant una disbiosi o pèrdua del component majoritari, els *Lactobacillus*, tot i que es més pronunciada en les dones que pateixen ITU sense el requisit de tenir relacions sexuals prèvies (126). En la microbiota fecal, observem una tendència de pèrdua de diversitat alfa només en el grup que pateix ITU independentment de les relacions sexuals. En els dos microbiomes, s'observa una disbiosi més pronunciada en les dones en què les relacions sexuals no semblen ser el factor predisponent.

5.6.3 Diversitat beta

En l'anàlisi de la diversitat beta, no s'ha detectat cap nivell de clusterització dels grups d'estudi en l'anàlisi dels components principals (figura 32) en la microbiota intestinal ni en la microbiota vaginal. Per valorar les diferències en tots els components, s'ha realitzat l'ANOVA amb la següent fórmula per al model:

Distància al centre

$$= \text{Aparició d'ITUr després de les relacions sexuals} + \text{Edat} + \text{IMC} \\ + \text{Menopausa}$$

El models no han detectat una agrupació significativa en el model de les mostres de microbiota intestinal ni en les de microbiota vaginal. Concloem, per tant, que no hi ha una gran diferència en les grans comunitats entre les dones amb ITUr segons l'aparició de l'ITU si aquesta està relacionada amb les relacions sexuals.

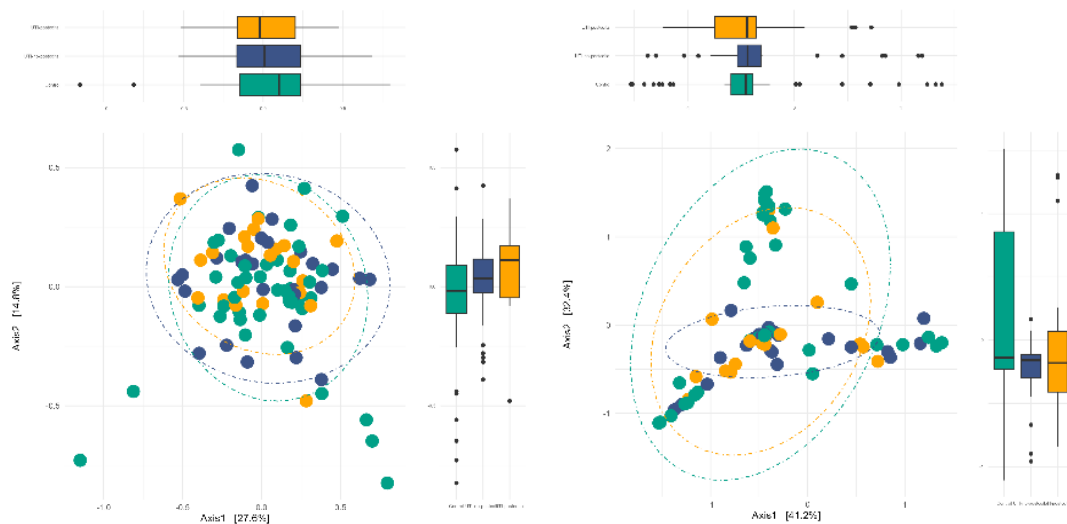


Figura 32: Doble anàlisi de components principals (dPCoA) de les mostres intestinals (esquerra) i de les mostres vaginals (dreta). En el gràfic es representen els dos components amb més variabilitat de l'anàlisi, un en cada eix, i cada rodona indica una mostra. En verd tenim els controls, en blau les dones amb ITUr no postcoital i en taronja les dones amb ITUr postcoital.

En les mostres intestinals no hem observat cap tipus de clusterització. Per contra, en la dPCoA de les mostres vaginals s'observa una concentració de les ITUr no postcoitals en el centre, cosa que denota una semblança major entre elles. Aquesta agrupació pot denotar una disbiosi específica de les dones que tenen ITUr no postcoital que podria indicar que el nivell d'alteració del microbioma pot tenir un paper en la determinació dels factors de risc de les pacients.

5.6.4 Anàlisi diferencial

En l'estudi dels taxons diferencials, s'ha realitzat el següent model per a cada nivell de taxó estudiat, és a dir. ordre, família, gènere i espècie:

LFC per a cada taxò

$$= \text{Aparició d'ITUr després de les relacions sexuals} + \text{Edat} + \text{IMC} \\ + \text{Menopausa}$$

* LFC = Variació logarítmica

* S'ha agafat les dones control com a grup de referència en el model lineal.

En el microbioma fecal, s'han detectat 597 espècies diferenciades en l'anàlisi en les dones que no desenvolupen l'ITU després de les relacions sexuals i 152 en les que sí. El nombre de taxons positius s'ha reduït a 473 i 6 per a les dones amb ITUr no postcoitals (figura 33), i a 140 i 5 per a les dones amb ITUr postcoitals després de fer les correccions del valor de p per BH i Bonferroni, respectivament (figura 34).

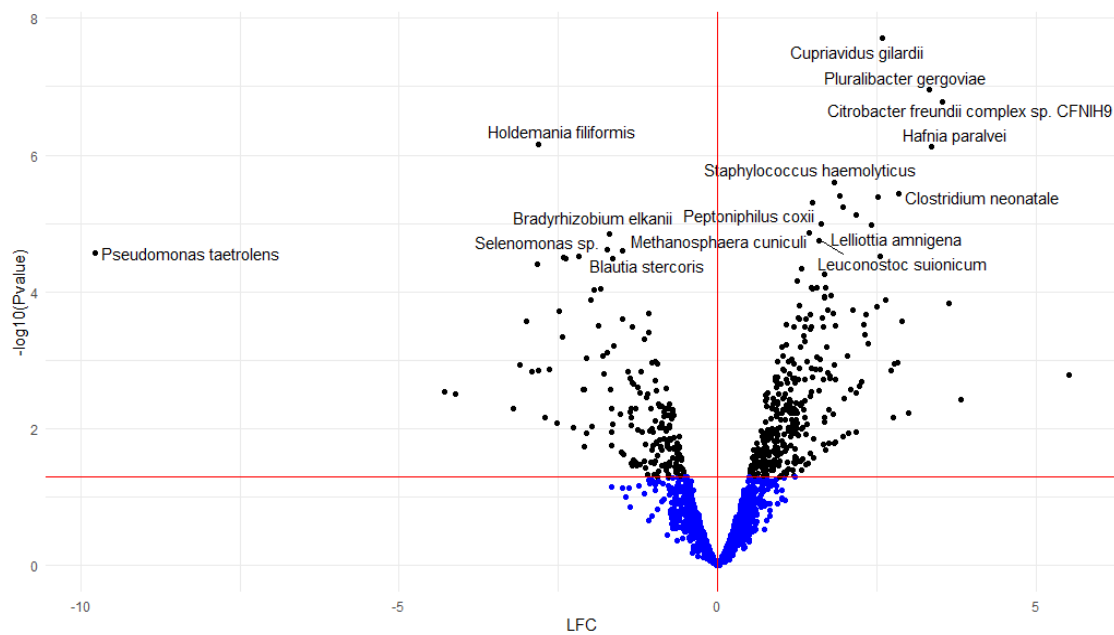


Figura 33A: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma intestinal comparant les dones control i les dones que tenen ITUr no postcoital. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per Bonferroni tenen el nom inclòs en el gràfic.

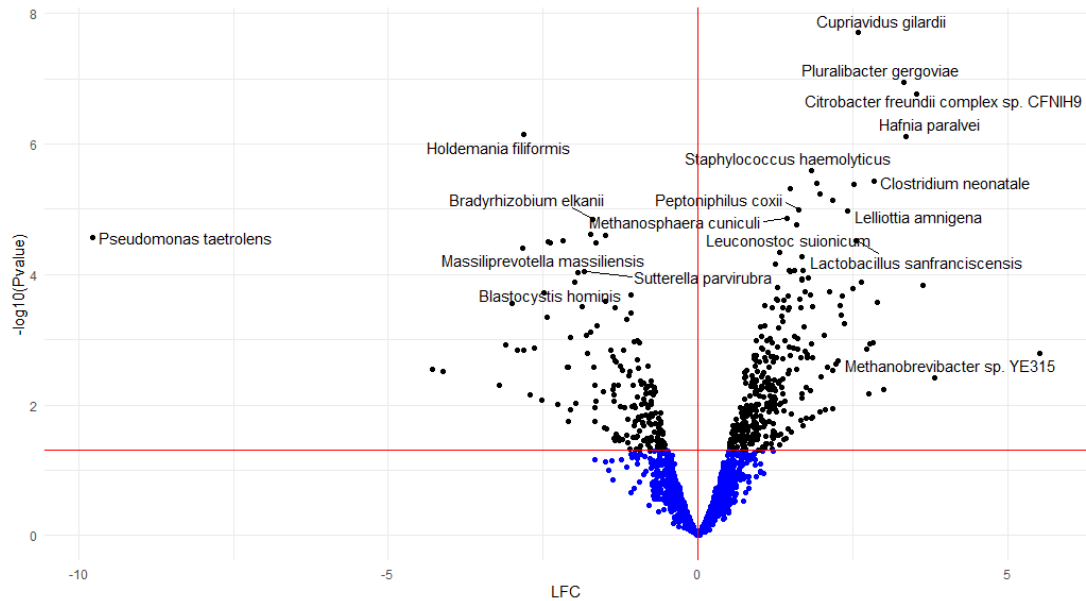


Figura 33B: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma intestinal comparant les dones control i les que tenen ITUr no postcoital. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció dl valor de p per BH tenen el nom inclòs en el gràfic.

En les dones amb ITUr, s'ha detectat un increment d'espècies d'uropatògens, on els més observats són *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus haemolyticus* i diverses espècies de *Klebsiella* i *Enterobacter* (figura 34). La resta d'espècies s'han trobat en ambdós grups, per tant no es troben relacionat amb l'activitat

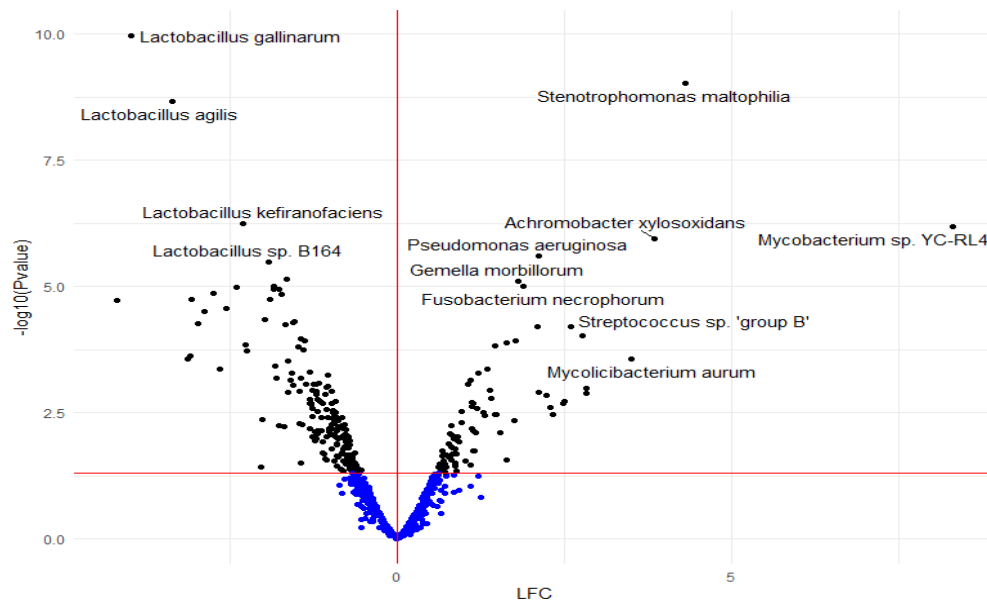


Figura 34A: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma intestinal comparant les dones control i les que tenen ITUr postcoital. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per Bonferroni tenen el nom inclòs en el gràfic.

sexual. Tot i això, en les dones en què no hi ha correlació entre les ITU i l'activitat sexual, l'LFC d'aquests microorganismes ha sigut més elevat.

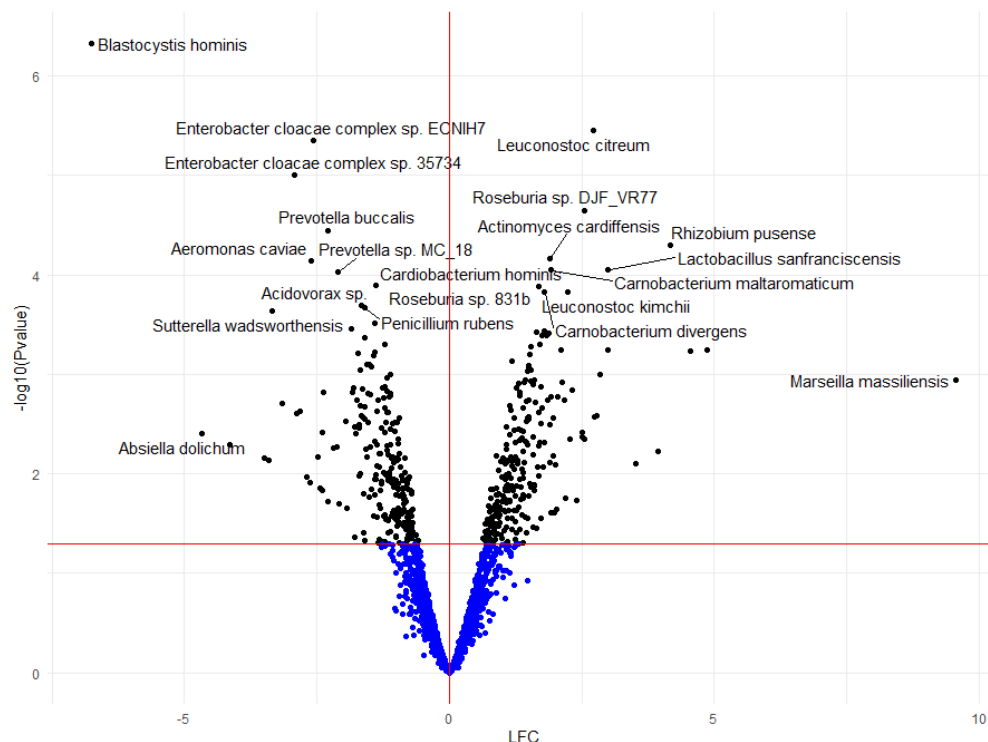


Figura 34B: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma intestinal comparant les dones control i les que tenen ITUr postcoital. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per BH tenen el nom inclòs en el gràfic.

En el microbioma vaginal, s'han observat 266 espècies significatives en l'anàlisi en les dones les recurrències de les quals no es presenten després de les

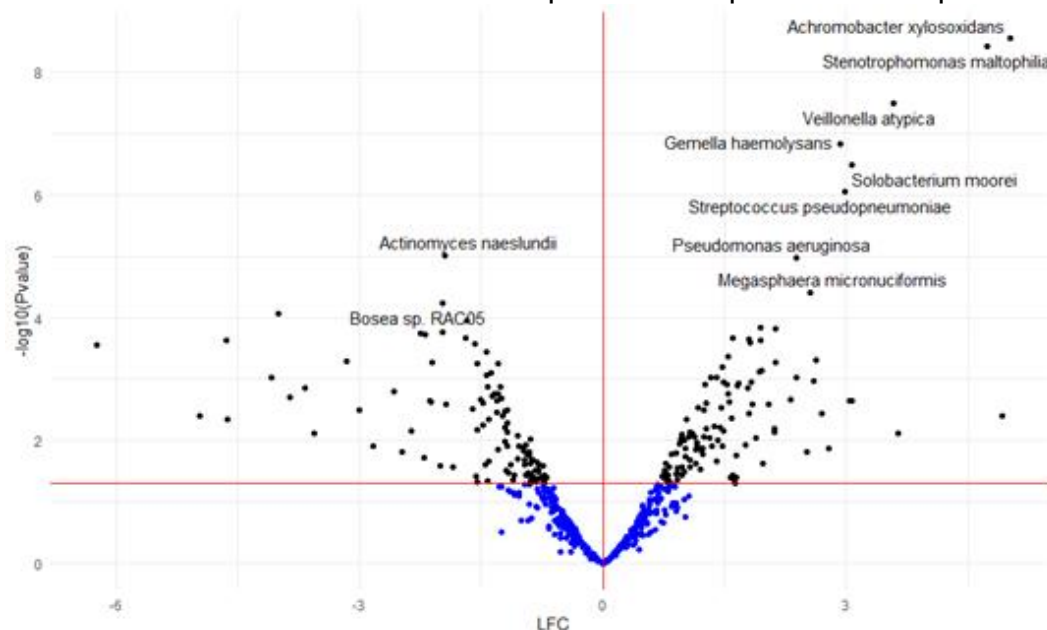


Figura 35A: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma vaginal comparant les dones control i les que tenen ITUr no postcoitals. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per Bonferroni tenen el nom inclòs en el gràfic.

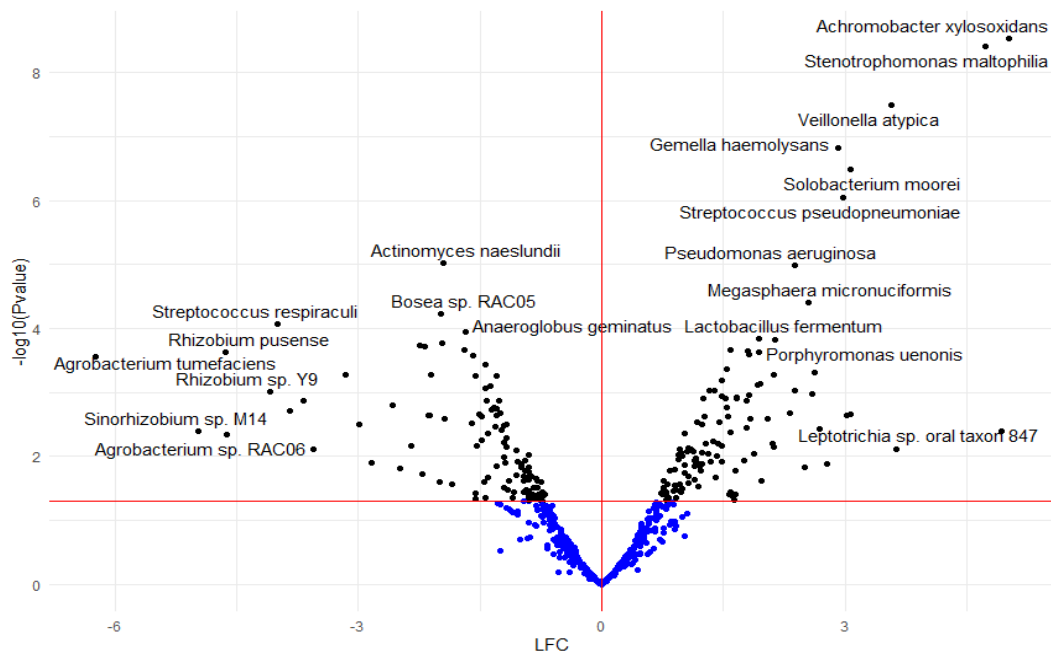


Figura 35B: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma vaginal comparant les dones control i les que tenen ITUr no postcoitals. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per BH, a l'esquerra, tenen el nom inclòs en el gràfic.

relacions sexuals i 67 en les que sí. En corregir el valor de p , els taxons significatius han disminuït a 174 i 29 per a les dones amb ITUr no postcoitals i a 28 i 14 per a les dones amb ITUr postcoitals utilitzant les correccions de BH i Bonferroni, respectivament (figura 35).

S'han trobat algunes espècies de *Klebsiella*, *Burkholderia* i *Streptococcus* del grup B i un gènere exclusivament fecal, *Facklamia*, augmentat en les dones amb ITUr que tenen ITU després de les relacions sexuals. En el grup de dones amb ITUr que no tenen relació amb el coït, els taxons analitzats més afectats han sigut espècies d'*Anaeroglobus*, que han disminuït, i de *Sutterella*, que han augmentat (figura 36).

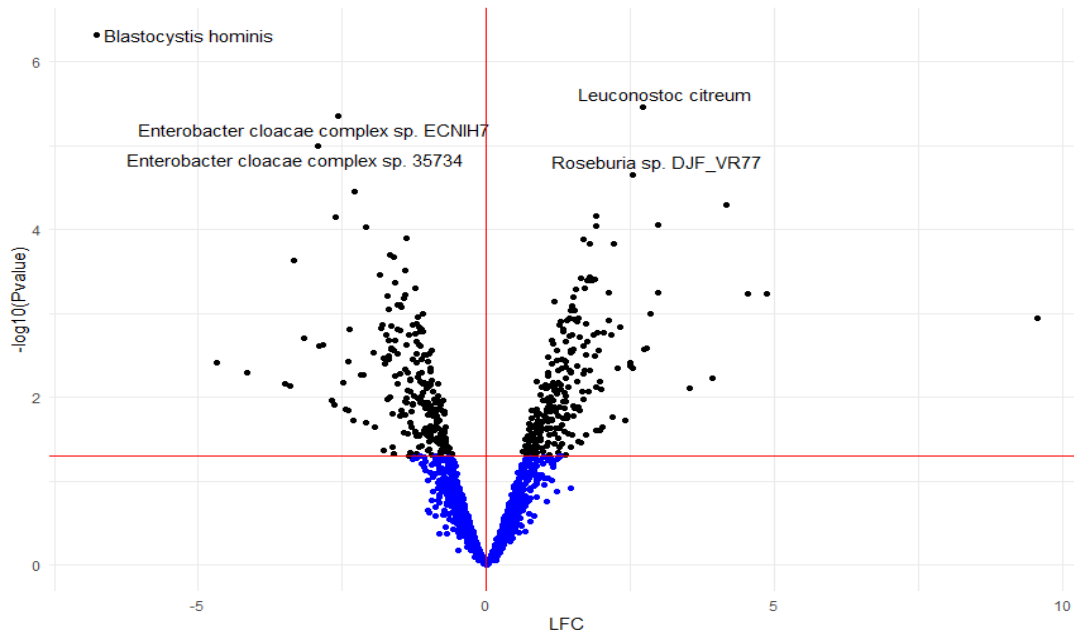


Figura 36A: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma vaginal comparant les dones control i les que tenen ITUr postcoitals. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p valor per Bonferroni tenen el nom inclòs en el gràfic.

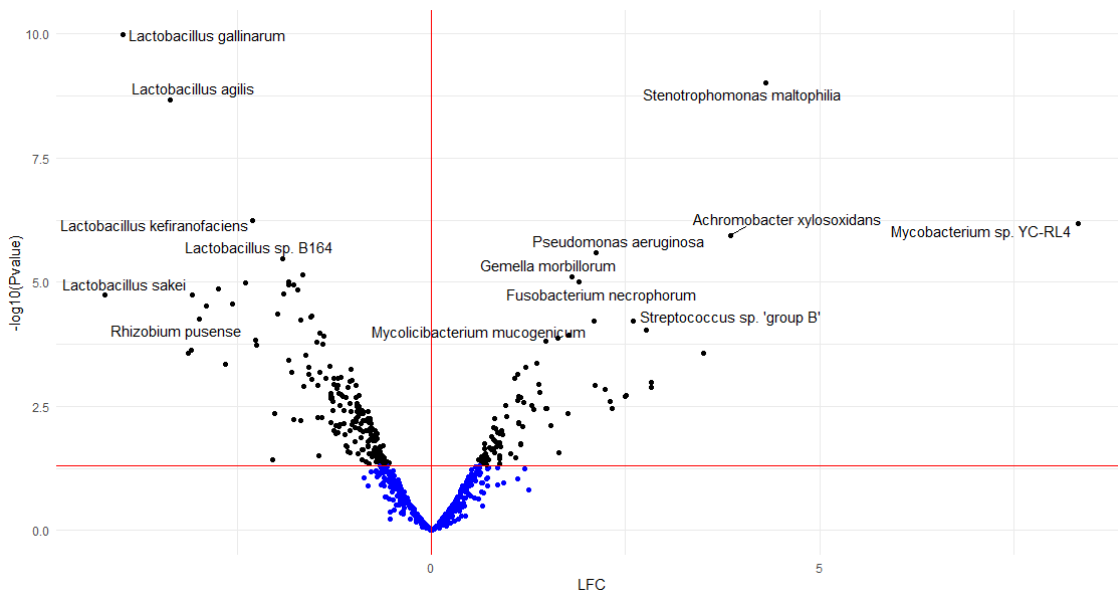


Figura 36B: Anàlisi diferencial de les espècies de microorganismes detectades en el microbioma vaginal comparant les dones control i les que tenen ITUr postcoitals. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció del valor de p per BH tenen el nom inclòs en el gràfic.

El nombre de microorganismes detectats en les dones que pateixen recurrències independentment de les relacions sexuals és superior al de les dones que pateixen aquestes recurrències després de les relacions sexuals. En el grup de les dones sense relació amb les relacions sexuals, observem que hi ha un augment d'espècies de *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus haemolyticus* i diverses espècies de *Klebsiella* i *Enterobacter*, uropatògens habituals (58).

S'observa que les dones que tenen recurrències sense relació amb les relacions sexuals tenen un nombre major de possibles uropatògens tant en el microbioma intestinal com en el vaginal.

5.6.5 Perfils vaginals

En l'estudi dels perfils vaginals, s'ha classificat la microbiota vaginal de cada participant en un dels cinc tipus vaginals descrits per Michael T. France (99). Aquests perfils estan determinats per la dominància de diferents espècies del gènere *Lactobacillus* i altres microorganismes, que defineixen l'ambient microbià del tracte vaginal.

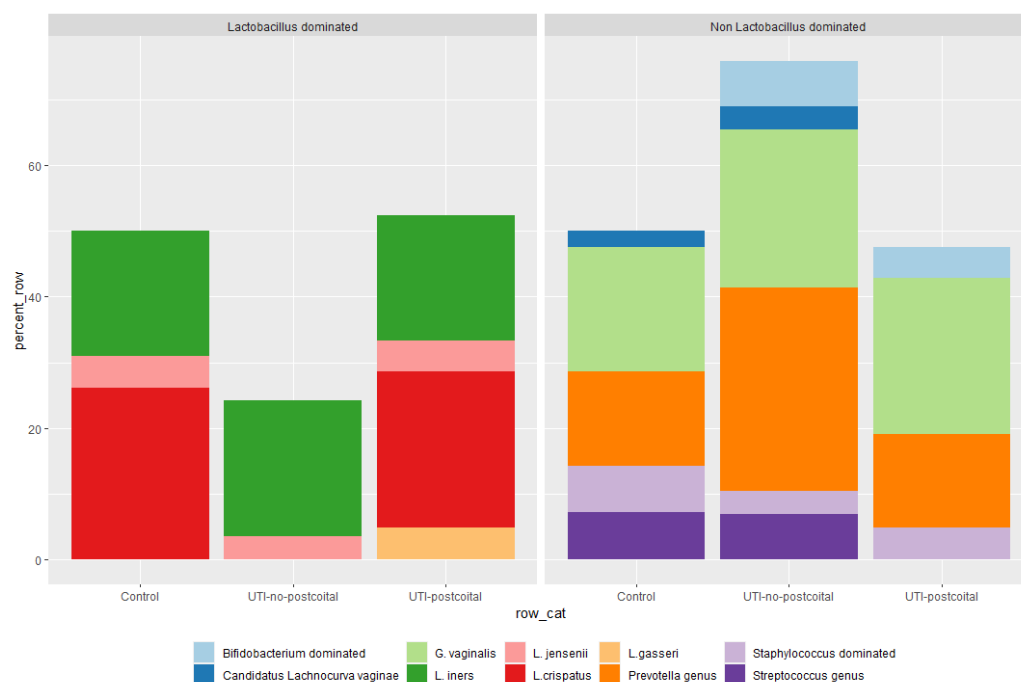


Figura 37: Percentatge de microbiomes que s'han classificat en cada tipus segons l'algoritme de Michael T. France. S'ha dividit el gràfic pels tipus dominats per *Lactobacillus* i no dominats per *Lactobacillus*, i pel percentatge de cada grup classificat dintre de cada grup.

Notablement, cap de les dones amb ITUr s'ha classificat dins del perfil vaginal dominat per *Lactobacillus crispatus* (figura 37). D'altra banda, el perfil caracteritzat per la dominància del gènere *Prevotella* ha estat significativament més freqüent en les dones que pateixen ITUr independentment de la seva activitat sexual. A més, no s'ha detectat cap perfil dominat per *Bifidobacterium* en les dones sense ITUr.

S'observa com tant les dones control com les dones amb ITUr relacionades amb les relacions sexuals tenen un percentatge semblant de microbiomes dominats per *Lactobacillus*. Observem que en les dones que pateixen ITUr no relacionades

amb les relacions sexuals es redueix el nombre de tipus dominants; no s'ha observat cap grup dominat per *Lactobacillus crispatus*. *L. crispatus* és l'espècie de *Lactobacillus* que genera el medi més àcid de tots els que habiten en la microbiota vaginal. S'observa que en el microbioma de les dones que tenen ITU independentment de les relacions sexuals, els únics lactobacils que predominen en algunes participants són *L. jensenni*, pel qual encara no s'ha descrit un rol de protecció, i *L. iners*, que s'ha observat que té una capacitat reduïda de produir un medi àcid, degut al fet que només sintetitza l'isòmer L de l'àcid làctic i, per tant, permet l'establiment de patògens amb més facilitat (129).

El perfil on predomina *Prevotella* està incrementat en les dones amb ITUr no relacionades amb les relacions sexuals, i està associat amb unes condicions de disbiosi vaginal i d'augment del pH que faciliten la proliferació d'uropatògens i, per tant, augmenten la predisposició a infeccions del tracte urinari (130). A més, el perfil de *Bifidobacterium* no es troba en les dones sanes, la qual cosa suggereix que aquest gènere pot tenir un paper menys rellevant en la protecció contra les ITUr, o bé que la seva presència és insuficient per prevenir aquestes infeccions al nivell que ho fa *Lactobacillus* (131).

5.7 Efecte del sòl pelvià en el microbioma

Degut a la diferencia significativa de la puntuació del sòl pelvià entre les dones control i les dones amb ITUr, s'ha realitzat l'anàlisi només en les dones amb ITUr per poder valorar-lo correctament. Per aquesta anàlisi, s'ha utilitzat la puntuació pelviana calculada amb la suma dels valors obtinguts en l'enquesta de puntuació del sòl pelvià.

5.7.1 Diversitat alfa

En l'anàlisi de la diversitat alfa, hem corregit l'anàlisi amb la següent fórmula:

$$\text{Índex de diversitat} = \text{Puntuació del sòl pelvià} * + \text{Edat} + \text{IMC} + \text{Menopausa}$$

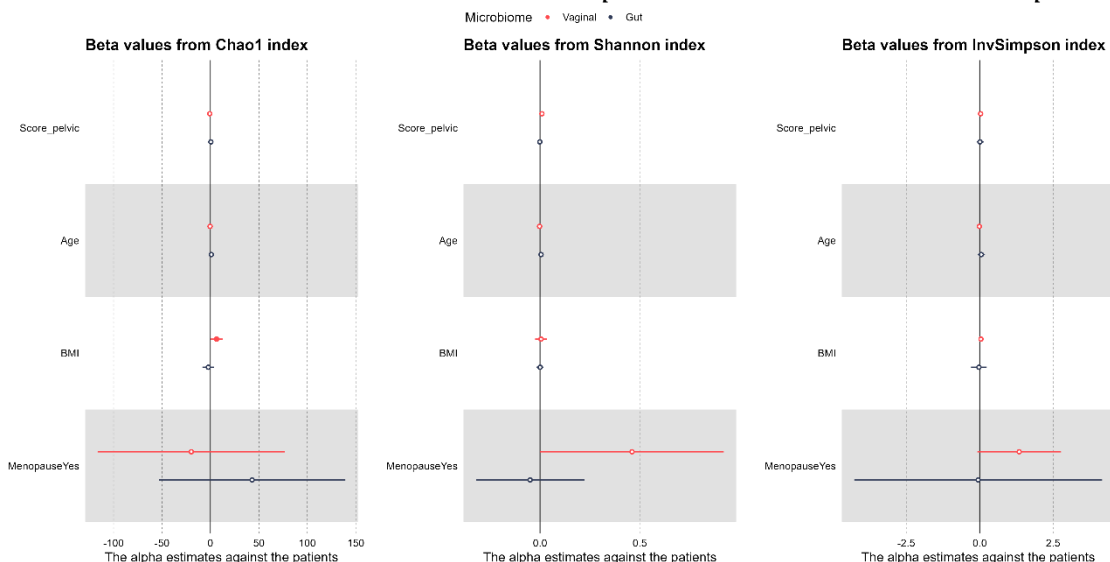


Figura 38: Efecte i desviació estàndard per a cada variable en el model de l'efecte de cada índex de diversitat alfa a cada variable en el microbioma intestinal i vaginal. S'ha generat el mateix model per a l'índex de diversitat Chao1 i els índex de diversitat Shannon i Simpson.

No s'ha observat cap efecte significatiu ni cap tendència en la riquesa ni en cap dels índex de diversitat que hem fet servir en els dos microbiomes que hem estudiat (figura 38). Per tant, veiem que l'efecte que tindrà l'estat del sòl pelvià en el microbioma vaginal i intestinal serà petit, per tant no és pas responsable de disbiosis importants.

5.7.2 Diversitat beta

En l'anàlisi de la diversitat beta, no s'ha representat la dPCoA de forma gràfica perquè parlem d'una variable numèrica. En l'ANOVA, amb la matriu de distància, no s'ha observat cap efecte significatiu a mesura que augmenta la puntuació del sòl pelvià (fecal: $p = 0,823$, vaginal: $p = 0,342$). No s'han trobat diferències entre ambdós microbiomes; per tant, l'efecte de l'estat del sòl pelvià no produeix un gran efecte en les comunitats microbianes.

5.7.3 Anàlisi diferencial

En l'anàlisi diferencial del microbioma intestinal segons l'estat del sòl pelvià s'han trobat 373 espècies significatives, de les quals, en corregir el valor de p , tenim 121 per BH i 5 per Bonferroni. En les dones amb un sòl pelvià més deteriorat,

amb major puntuació, s'ha observat un increment de *Proteus*, *Citrobacter* i *Enterococcus* en el microbioma intestinal.

En l'anàlisi diferencial del microbioma vaginal segons l'estat del sòl pelvià s'han trobat 196 espècies significatives, de les quals, en corregir el valor de p , han quedat 81 per BH i 7 per Bonferroni. A major puntuació, i per tant pitjor condició del sòl pelvià, alguns taxons dels gèneres, *Proteus*, *Sutterella* i *Rhizobium* es troben en major proporció. En dones amb un sòl pelvià en millor estat s'ha trobat un augment de *Ureaplasma* i *Anaerococcus*.

Tot i que no hi hem trobat publicacions sobre l'efecte del deteriorament del sòl pelvià en la microbiota intestinal, sí se n'ha observat l'efecte en la microbiota intestinal en dones amb problemes anatòmics del sòl pelvià. Una metaanàlisi amb el gen *16s rDNA* en la microbiota vaginal en la població general ha detectat un augment de bacteris fecals (132), efecte que nosaltres no hem observat, potser degut al baix nombre de mostres en aquesta subanàlisi. En la nostra anàlisi, hem observat l'increment d'alguns patògens (el més important, *Proteus*) amb la capacitat de generar pedres calcàries, tot i que no s'ha documentat l'aparició de pedres en les participants de l'estudi.

5.8 El viroma en la infecció recurrent d'orina

En aquest estudi, s'ha desenvolupat un model per avaluar l'efecte del viroma en la microbiota vaginal i intestinal, amb un enfocament específic en la comparació dels bacteriòfags més abundants, entre els grups de dones amb ITUr i les dones control. Aquest model ha permès identificar possibles diferències en la composició del viroma entre els dos grups d'estudi i destacar la influència potencial dels bacteriòfags sobre la composició i funció del microbioma.

5.8.1 Anàlisi diferencial

En l'anàlisi diferencial del microbioma intestinal segons l'estat del sòl pelvià, s'han trobat 684 espècies significatives, de les quals, en corregir el valor de p , tenim 91 per BH i 2 per Bonferroni. S'observa que les espècies de bacteriòfags més freqüentment detectades en la microbiota intestinal de les dones amb ITUr són *Lactococcus* F517F i *Salmonella* epsilon 34. En les dones control, en canvi, els bacteriòfags més significatius són *Ralstonia* virus Ancahing i *Achromobacter* virus Axy10 (figura 39). En l'anàlisi diferencial del microbioma vaginal s'han trobat

135 espècies significatives, de les quals, en corregir el valor de p , s'observen les xifres significatives de 94 per BH i 28 per Bonferroni. Les espècies de fags més incrementades en la microbiota vaginal de les dones amb ITUr son Crassphage cr131_1 i *Klebsiella* virus F48. En les dones control, els més significatius són *Enterobacteria* virus BP4795 i *Microbacterium* virus Zeta1847 (figura 40).

En l'estudi, s'han detectat alguns taxons de fags coincidents dels dos microbiomes augmentats en el mateix grup d'estudi (control o dones amb ITUr). En la microbiota fecal de les dones amb ITUr, s'han trobat incrementats fags que infecten espècies d'uropatògens. En el microbioma vaginal de les dones amb ITUr, s'han trobat incrementats un gran nombre de fags que són específics de uropatògens, com ara els fags *Escherichia* virus RCS47, *Acinetobacter* virus PhT2, i *Klebsiella* virus F48. En les dones control, s'observa un augment de fags que infecten *Lactobacillus* en el microbioma vaginal entre d'altres, la qual cosa fa palesa la gran quantitat de *Lactobacillus* que s'observen en les dones control. Tot i que no hi ha gaires publicacions sobre els fags, ja siguin els del microbioma intestinal o els del vaginal, sí que es valora la idea de detectar possibles soques o grups de soques, i avaluar-ne la capacitat com a marcadors i la interacció amb l'hoste a partir del control dels bacteris del microbioma (133).

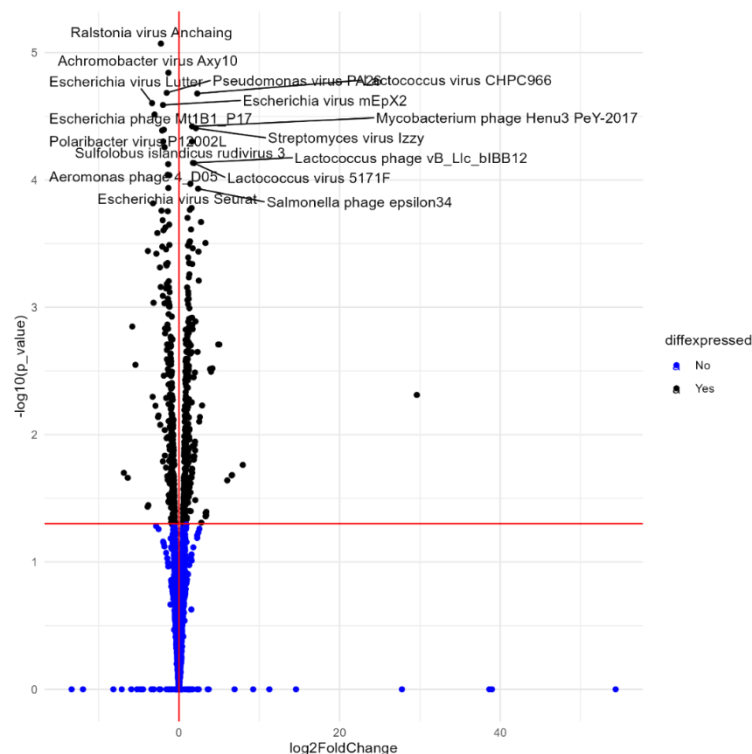


Figura 39: Anàlisi diferencial dels fags detectats en el microbioma intestinal. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció de BH tenen el nom inclòs en el gràfic.

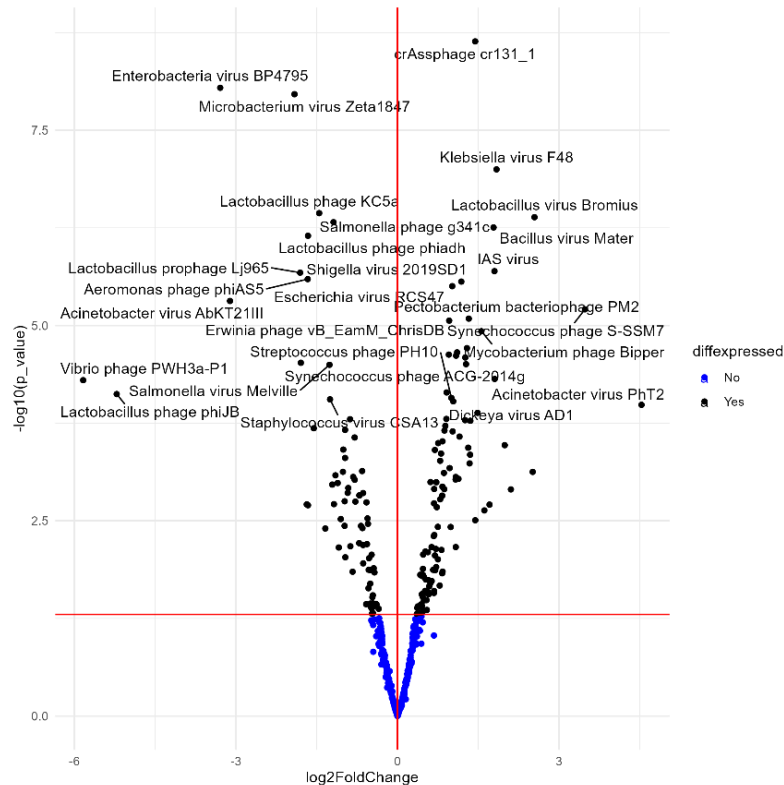


Figura 40: Anàlisi diferencial dels fags detectats en el microbioma intestinal. Els punts de color negre són els taxons significatius. Els que són positius per la correcció de BH tenen el nom inclòs en el gràfic.

5.8.2 Correlació per hoste

S'ha realitzat una anàlisi per determinar l'abundància de fags basant-nos en l'hoste bacterià que infecten per cada grup d'estudi. En el microbioma fecal, s'han detectat tres grups principals de fags, els quals infecten bacteris dels gèneres *Streptomyces*, *Lactococcus* i *Streptococcus*; tots es troben augmentats en les dones amb ITUr. El microbioma vaginal presenta una major diversitat de fags, amb un nombre més elevat que es correlaciona amb diversos gèneres bacterians. Entre els fags més representats en les dones amb ITUr s'han identificat els que infecten bacteris dels gèneres *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* i *Achromobacter*. Aquesta diversitat més elevada en el microbioma vaginal podria reflectir una disbiosi més pronunciada, especialment en les dones amb ITUr, on els bacteris patògens o oportunistes tendeixen a dominar en detriment dels *Lactobacillus* (figura 41).

Els fags que s'han detectat majoritàriament en les dones amb ITUr són diversos, però entre ells s'han detectat majoritàriament uropatògens, els quals es troben

en majors quantitats degut a l'abundància dels bacteris que fagociten. L'ús de fags per detectar el seu hoste, el bacteri que fagociten, podria ser un mètode més sensible a l'hora d'identificar marcadors, ja que hem observat fags d'algunes espècies com *Serratia* que no s'han detectat en l'anàlisi bacteriana. Aquestes troballes posen de manifest la necessitat d'obrir línies de recerca innovadores sobre el possible paper del viroma i la patogènia de les infeccions urinàries recurrents.

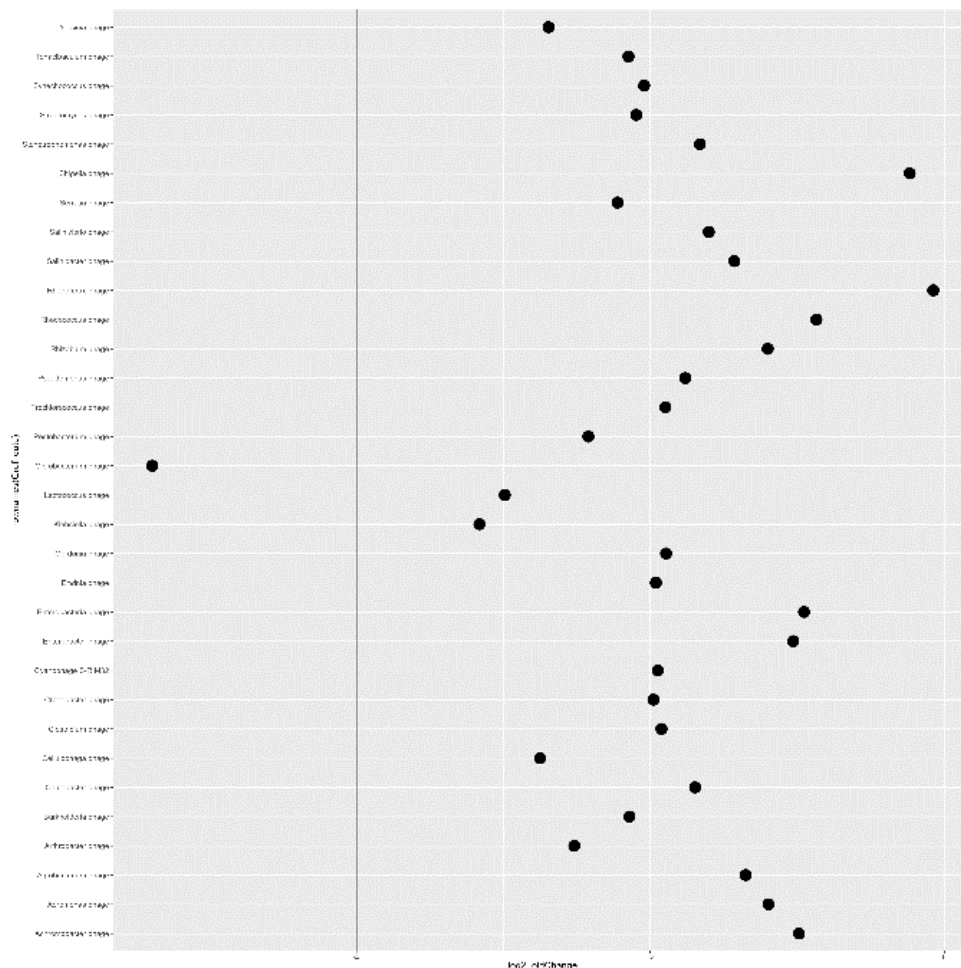


Figura 41: Anàlisi diferencial dels fags segons l'hoste que infecten en el microbioma vaginal. A l'eix X tenim l'efecte; com més a la dreta, més es troben en les dones amb recurrències. Tots els valors són significatius per FDR (inferior a 0.05).

S'observa que hi ha una alta correlació entre el fags que afecten cada grup d'estudi i els bacteris que trobem en una abundància més alta. Aquesta correlació podria ser beneficiosa per la identificació de nous biomarcadors en la microbiota, donat la seva alta especificitat per la soca .

5.9 Les funcions dels gens del microbioma en la infecció urinària recurrent

Per a l'anàlisi de funcions proteiques, s'ha identificat un total de 25.813 proteïnes significatives. D'aquestes, 17.905 proteïnes han estat expressades sobre tot en les dones amb ITUr, i altres 7.908 proteïnes han sigut més freqüents en les dones control.

Per valorar quines funcions estan més representades en cada microbioma, s'ha realitzat una anàlisi d'enriquiment funcional amb la base de dades de GO. S'han detectat 78 funcions significatives, a 41 de les quals es troben més gens relacionats en les dones amb ITUr, mentre que les altres 37 són més freqüents en les dones control. Entre aquestes funcions, les vies de reparació de l'ADN, les rutes de secreció de proteïnes i els transportadors de potassi estan més representades en les dones amb ITUr. Aquestes vies podrien indicar una resposta de l'ecosistema bacterià a l'estrès i a la necessitat de reparació cel·lular, possiblement com a resposta a les condicions de disbiosi que caracteritzen aquest grup.

Altres funcions que s'han observat incrementades en les dones amb ITUr són les bombes d'expulsió activa, les activitats d'helicasa i les proteïnes amb capacitat d'unir-se a la penicil·lina. D'aquestes últimes, hem trobat que les proteïnes relacionades amb la resistència a betalactàmics són les més abundants (taula 2)

Gen de resistència	LFC	Valor de p
<i>tem</i>	0,61	$1,41 \times 10^{-7}$
<i>bla</i> _{OXA-455}	5,02	$7,71 \times 10^{-6}$
<i>mrdA</i>	1,36	$4,23 \times 10^{-6}$
<i>bla</i>	0,39	$5,45 \times 10^{-3}$
Classe A beta-lactamasa	0,83	$1,32 \times 10^{-3}$

Taula 2: Els 5 gens majoritaris detectats amb la funció d'unió a betalactamases. S'ha establert el nombre de canvis logarítmics (LFC) que es troba incrementat en les dones amb ITUr.

Després, s'ha realitzat un enriquiment amb la base de dades de KEGG. S'han detectat 5 rutes metabòliques significatives, de les quals 1 es troba més expressada en les dones amb ITUr, mentre que les altres 4 són més freqüents o estan més representades en les dones control. En aquest cas, s'ha valorat també les rutes amb un *normalized enrichment score* (NES) superior a 1,5, i se

n'han recuperat 5 en les dones amb ITUr i 6 en les controls, totes elles eren estadísticament significatives. En les dones amb ITUr s'ha observat més gens de les rutes del metabolisme de la tirosina, d'N-glicans i de degradació de la dioxina. També s'han recuperat rutes de captació de ferro i rutes d'elongació d'àcids grassos. En les dones control, s'han detectat incrementades rutes del metabolisme d'àcids biliars i rutes de producció de betalactàmics.

En les dones amb ITUr, s'observa un increment de gens associats a factors de virulència com són els gens de proteïnes amb capacitat de captar ions de metalls, o resistències antibiòtiques com proteïnes relacionades amb la resistència a betalactàmics. Aquest augment de detecció en aquestes funcions pot ser degut a l'augment de bacteris uropatògens o al continu ús d'antibiòtics en les dones amb recurrències. S'observa com, malgrat absència de tractament antibiòtic recent de les pacients incloses en l'estudi (per un dels criteris d'exclusió de l'estudi: haver pres antibiòtics en els últims 6 mesos), els gens de resistència perduren en la microbiota tot i no haver-hi infecció activa. Això pot causar que l'ambient generi una predisposició a necessitar concentracions superiors d'antibiòtics degut al fet que molts dels gens s'alliberen de vegades fora de la cèl·lula. S'ha descrit en la literatura un augment dels gens de resistència en microbiomes de persones tractades freqüentment amb antimicrobians (134).

En dones amb ITUr s'ha observat augment de gens d'algunes rutes, com ara les del metabolisme de la tirosina i l'aparició d'N-glicans, que es troben correlacionades amb un augment d'inflamació de l'intestí (135,136). La reducció d'SCFA degut a la seva elongació pot col·laborar a aquest estat d'inflamació de l'intestí (137). També s'han detectat rutes de degradació de compostos com la dioxina, que és proinflamatòria (138), tot i que la dioxina no es troba de forma habitual en la dieta, per tant, se sospita que compostos com aquest en la dieta de les dones amb ITUr que podrien facilitar aquesta inflamació. Això ens pot indicar que aquest estat d'inflamació crònica podria estar estretament relacionat amb les recurrències, ja que sobreestimularia el sistema immunitari de l'hoste i no permetria una correcta acció a la bufeta (111). També s'han detectat rutes de captació del ferro, establertes com a factors de virulència en algunes espècies com, per exemple, *Acinetobacter baumannii* (139). A les dones control s'ha detectat la ruta del metabolisme dels àcids biliars, que s'ha determinat que són

proinflamatoris (140). Per tant, veiem que la tendència a les dones control, a diferència de les dones amb ITUr, és reduir la inflamació, en conseqüència, la sobreestimulació del sistema immunitari. No s'ha trobat res descrit en relació amb la generació de betalactàmics en el microbioma intestinal, però aquests podrien actuar com a controladors de possibles patògens en una microbiota sana.

En conclusió, fruit de tota aquesta anàlisi de les microbiotes intestinal i vaginal de les dones amb ITUr i la comparació amb les dones control, podem dir que a les dones amb ITUr s'ha detectat una notòria disbiosi en comparació amb les dones control de l'estudi, per tant, pensem que aquesta disbiosi està relacionada amb l'aparició de les recurrències. Quan s'analitzen aquestes diferències en detall, es detecta que a la microbiota intestinal de les dones amb ITUr hi ha un augment de bacteris proinflamatoris, com *Faecalibacterium*, que condueix a un estat crònic d'inflamació i, alhora, a una reducció dels bacteris productors d'SCFA, que redueixen aquesta inflamació(54). Aquesta alteració s'ha detectat en diverses malalties, i és causant d'una disfunció del sistema immunitari, la qual deriva en una predisposició a partir aquestes malalties (110,116).

A la microbiota vaginal, s'ha observat una notable pèrdua de la població de bacteris productors d'àcid làctic, majoritàriament *Lactobacillus*, que són els encarregats de produir el pH àcid que protegeix contra les infeccions (123,129). Aquesta pèrdua de pH àcid pot ser un dels motius pels quals hem observat l'augment de diversitat. La disbiosi mantinguda en el temps de les microbiotes a les dones amb ITUr genera que les interaccions entre microbiota vaginal i intestinal siguin més freqüents. Aquest augment de freqüència juntament amb la disminució de l'efecte protector (per exemple, quan el pH esdevé més alcalí) pot conduir a un augment de les infeccions urinàries.

Per altra banda, no hem estat capaços de detectar marcadors per explicar les diferències entre les dones amb ITUr relacionades amb l'activitat sexual i les que no. Hem demostrat que el desplaçament de la microbiota, intestinal i vaginal, a les dones amb ITUr no es correlaciona amb el fet que la infecció tingui relació cronopatològica o no amb les relacions sexuals. Malgrat les limitacions del nostre estudi, ens permet plantejar la hipòtesi que les recurrències s'originen per una

disbiosi en la microbiota. En el casos on la disbiosi és molt pronunciada, aquesta es independent d'efectes externs com podrien ser les relacions sexuals. Per contra, sembla que quan la microbiota només està lleugerament alterada, les dones necessiten un estímul extern, com poden ser les relacions sexuals, perquè es produeixin les recurrències d'aquestes infeccions.

En l'estudi del sòl pelvià, no s'ha observat cap modificació qualitativa important del microbioma, però sí que s'ha observat que puntuacions més elevades (que signifiquen un major deterior de la musculatura pelviana) es correlacionen amb més abundància de *Proteus*. La lleugera alteració dels microbiomes detectats segons l'estat del sòl denota que l'alteració de la musculatura pot implicar modificacions en els dos microbiomes en estudi.

En la fracció vírica dels microbiomes de les dones amb ITUr s'han observat canvis en les poblacions de fags. En les dones amb ITUr s'ha trobat un increment de fags que afecten als uropatògens, la qual cosa denota un increment d'aquests en la microbiota intestinal i vaginal.

Tot i que el nombre de mostres de l'estudi és suficient per observar les variacions del microbioma en la infecció urinària, sí que poden estar esbiaixats per la microbiota local. Per tant, es requereixen més estudis, e idealment una metaanàlisi amb mostres procedents de diverses regions del món, per poder saber si aquests resultats son o no extrapolables. Una altra limitació de l'estudi és que el nombre de participants no ha permès la correcció en els models estadístics amb un gran nombre de variables de l'enquesta, per tant, s'han escollit aquelles variables on la literatura marcava un efecte més gran sobre la microbiota. Per contra, el fet que el mostratge de l'estudi era gairebé monocèntric permet reduir les variacions en el microbioma del medi on viuen les dones i, per tant, permet centrar l'efecte observat en la infecció urinària.

Respecte a les rutes metabòliques, les funcions més abundants observades a la microbiota intestinal de les dones amb ITUr són diferents de les observades a les dones control. S'ha vist com en les dones controls la capacitat de desinflamar l'intestí és important i, a la inversa, a les dones amb ITUr s'han trobat rutes proinflamatòries. Algunes rutes en les dones amb ITUr s'han relacionat amb la

degradació de compostos inflamatoris de químics com la dioxina, que no haurien de ser habituals a la dieta.

6 Conclusions

1. De les diferents variables demogràfiques estudiades entre ambdós grups (dones amb infecció del tracte urinari recurrent [ITUr] i dones control), no s'observen diferències estadísticament significatives entre totes les variables, llevat de la puntuació de l'estat de la musculatura pelviana.
2. En la composició del microbioma intestinal de les dones amb ITUr, es veu un augment relatiu significatiu dels gèneres *Clostridium*, *Eubacterium* i *Ruminococcus*, i una disminució relativa dels gèneres *Parabacteroides*, *Faecalibacterium* i *Alistipes*.
3. Respecte al microbioma vaginal de les dones amb infeccions urinàries de repetició, s'observa un augment relatiu significatiu dels gèneres *Achromobacter*, *Stenotrophomonas* i *Prevotella*, i una disminució significativa del gènere *Lactobacillus*.
4. En l'anàlisi de la diversitat alfa de les dones amb infeccions urinàries de repetició, s'observa una tendència a la disminució en la microbiota intestinal i un augment significatiu en la microbiota vaginal. També s'observa una disbiosi en ambdós microbiomes, a causa de la pèrdua d'espècies en el microbioma intestinal i la pèrdua de la població de l'espècie més important en el microbioma vaginal.
5. A les dones amb ITUr, s'ha trobat en els microbioma intestinal i vaginal, una major abundància d'uropatògens, com ara *E. Coli*, *P. aeruginosa* i *S. maltophilia* entre d'altres.
6. Els gèneres *Gramella*, *Streptococcus* i *Biberstenia* s'han identificat com a biomarcadors en la microbiota intestinal de les dones amb ITUr. En canvi, els gèneres *Leptothrix*, *Holdemania* i *Cardiobacterium* poden ser biomarcadors en les dones control.
7. Els gèneres *Bordetella*, *Brevundimonas* i *Stenotrophomonas* s'han identificat com a biomarcadors en la microbiota vaginal de les dones amb ITUr. En canvi, els gèneres *Acidovorax*, *Sphingomonas* i *Xanthomonas* poden ser biomarcadors en les dones control.

8. La disbiosi en les dones amb ITUr es veu més pronunciada en les dones que pateixen les ITU independentment de les relacions sexuals, amb la disminució de la diversitat alfa en la microbiota intestinal i l'aparició d'espècies proinflamàtòries, així com un augment de la diversitat alfa en la microbiota vaginal, degut a l'aparició d'uropatògens, molt més marcada que a les dones que només pateixen un episodi després de les relacions.
9. Un deteriorament del sòl pelvià en les dones amb ITUr, en ambdues microbiotes, es correlaciona amb un augment del gènere *Proteus*.
10. En la microbiota intestinal i vaginal de les dones amb ITUr, s'ha trobat un increment de l'abundància relativa de fags, particularment dels relacionats amb els uropatògens.
11. Les vies de reparació de l'ADN, de secreció de proteïnes i transportadors de potassi es troben més representades en les dones amb ITUr. També s'ha trobat en aquest grup, mecanismes de resistències als antimicrobians, relacionats amb la resistència als betalactàmics o alteracions en diferents bombes d'efluxió.
12. En l'anàlisi de les rutes metabòliques dels gens observats en el microbioma intestinal de les dones amb ITUr, s'han vist rutes proinflamàtòries i relacionades amb la degradació de compostos inflamatoris, al contrari que a les dones sanes, on s'han vist increments d'altres rutes metabòliques
13. En l'anàlisi de les capacitats funcionals del microbioma vaginal, s'ha observat la reducció de rutes que generen compostos àcids o implicades en la generació d'àcid làctic. Aquestes rutes indiquen l'augment del pH en les dones amb ITUr.

7 Bibliografia

1. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 24 maig 2015;13(5):269-84.

2. Gupta K, Grigoryan L, Trautner B. In the clinic® urinary tract infection. *Ann Intern Med.* 3 octubre 2017;167(7):ITC49-64.
3. Foxman B. Urinary Tract Infection Syndromes: Occurrence, Recurrence, Bacteriology, Risk Factors, and Disease Burden. *Infect Dis Clin North Am.* 1 març 2014;28(1):1-13.
4. Ciani O, Grassi D, Tarricone R. An Economic Perspective on Urinary Tract Infection: The “Costs of Resignation”. *Clin Drug Investig.* abril 2013;33(4):255-61.
5. de Cueto M, Aliaga L, Alós JI, Canut A, Los-Arcos I, Martínez JA, et al. Resumen ejecutivo del diagnóstico y tratamiento de las infecciones del tracto urinario. Guía de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1 maig 2017;35(5):314-20.
6. Nicolle LE. Urinary Tract Infection. *Crit Care Clin.* juliol 2013;29(3):699-715.
7. Geerlings SE. Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr.* 14 octubre 2016;4(5).
8. Meštrović T, Matijašić M, Perić M, Čipčić Paljetak H, Barešić A, Verbanac D. The Role of Gut, Vaginal, and Urinary Microbiome in Urinary Tract Infections: From Bench to Bedside. *Diagn* 2021 Vol 11 Page 7. 22 desembre 2020;11(1):7.
9. Keating KN, Perfetto EM, Subedi P. Economic burden of uncomplicated urinary tract infections: direct, indirect and intangible costs. <http://dx.doi.org/101586/1473716754457>. agost 2014;5(4):457-66.
10. Aydin A, Ahmed K, Zaman I, Khan MS, Dasgupta P. Recurrent urinary tract infections in women. *Int Urogynecology J* 2014 266. 20 novembre 2014;26(6):795-804.
11. Franco AVM. Recurrent urinary tract infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 1 desembre 2005;19(6):861-73.
12. Ferry SA, Holm SE, Stenlund H, Lundholm R, Monsen TJ. The natural course of uncomplicated lower urinary tract infection in women illustrated by a randomized placebo controlled study. *Scand J Infect Dis.* 2004;36(4):296-301.

13. Andreu A, Cacho J, Coira A, Lepe JA. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. gener 2011;29(1):52-7.
14. Argente M, Miró E, Martí C, Vilamala A, Alonso-Tarrés C, Ballester F, et al. Molecular characterization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains after a carbapenem resistance increase in Catalonia. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 1 febrer 2019;37(2):82-8.
15. Schwenger EM, Tejani AM, Loewen PS. Probiotics for preventing urinary tract infections in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 23 desembre 2015;2015(12):CD008772.
16. Barnoiu OS, Sequeira-García del Moral J, Sanchez-Martínez N, Díaz-Molina P, Flores-Sirvent L, Baena-González V. American cranberry (proanthocyanidin 120 mg): Its value for the prevention of urinary tract infections after ureteral catheter placement. *Actas Urol Esp Engl Ed*. 1 març 2015;39(2):112-7.
17. Ala-Jaakkola R, Laitila A, Ouwehand AC, Lehtoranta L. Role of D-mannose in urinary tract infections – a narrative review. *Nutr J*. 22 març 2022;21(1):18.
18. Prattley S, Geraghty R, Moore M, Somani BK. Role of Vaccines for Recurrent Urinary Tract Infections: A Systematic Review. *Eur Urol Focus*. 15 maig 2020;6(3):593-604.
19. Gordon S. Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. *J Innate Immun*. 2016;8(3):223-7.
20. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 30 juny 2020;8(1):103.
21. Woese CR. The archaeal concept and the world it lives in: a retrospective. *Photosynth Res*. 2004;80:361-72.
22. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(11):5088.

23. Winker S, Woese CR. A Definition of the Domains Archaea, Bacteria and Eucarya in Terms of Small Subunit Ribosomal RNA Characteristics. *Syst Appl Microbiol.* 1 octubre 1991;14(4):305-10.
24. Peterson AT. Defining viral species: making taxonomy useful. 2014;
25. Yucesan E. Carl von Linné: The Development of the Idea of Binomial Nomenclature: <https://doi.org/101177/09677720211065352>. 4 gener 2022;
26. 5.1: Linnaean Classification - Biology LibreTexts [Internet]. [citat 24 juliol 2022]. Disponible a:
[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Book%3A_Introductory_Biology_\(CK-12\)/05%3A_Evolution/5.01%3A_Linnaean_Classification](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Book%3A_Introductory_Biology_(CK-12)/05%3A_Evolution/5.01%3A_Linnaean_Classification)
27. Paine RT, Tegner MJ, Johnson EA. Compounded Perturbations Yield Ecological Surprises. *Ecosyst* 1998 16. 1998;1(6):535-45.
28. Schwartz DJ, Langdon AE, Dantas G. Understanding the impact of antibiotic perturbation on the human microbiome. *Genome Med.* 28 setembre 2020;12(1).
29. de Bustamante MM, Plummer C, Macnicol J, Gomez D. Impact of Ambient Temperature Sample Storage on the Equine Fecal Microbiota. *Anim Open Access J MDPI.* 1 març 2021;11(3):1-10.
30. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci.* 1 febrer 2017;20(2):145-55.
31. Proctor LM, Creasy HH, Fettweis JM, Lloyd-Price J, Mahurkar A, Zhou W, et al. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature.* 30 maig 2019;569(7758):641.
32. Kern L, Abdeen SK, Kolodziejczyk AA, Elinav E. Commensal inter-bacterial interactions shaping the microbiota. *Curr Opin Microbiol.* 1 octubre 2021;63:158-71.
33. Galloway-Peña J, Hanson B. Tools for Analysis of the Microbiome. *Dig Dis Sci.* 1 març 2020;65(3):674.

34. Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, et al. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol* 2018 169. 24 juny 2018;16(9):540-50.
35. Brubaker L, Putonti C, Dong Q, Wolfe AJ. The human urobiome. *Mamm Genome* 2021 324. 2 març 2021;32(4):232-8.
36. Markowski MC, Boorjian SA, Burton JP, Hahn NM, Ingersoll MA, Vareki SM, et al. The Microbiome and Genitourinary Cancer: A Collaborative Review. *Eur Urol*. 1 abril 2019;75(4):637-46.
37. Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, Blaser MJ. Role of the microbiome in human development. *Gut*. 1 juny 2019;68(6):1108.
38. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier D Le, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nat* 2011 4737346. 20 abril 2011;473(7346):174-80.
39. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med*. 27 abril 2016;8(1).
40. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 15 febrer 2019;76(3):473-93.
41. Thomas-White K, Brady M, Wolfe AJ, Mueller ER. The Bladder Is Not Sterile: History and Current Discoveries on the Urinary Microbiome. *Curr Bladder Dysfunct Rep* 2016 111. 30 gener 2016;11(1):18-24.
42. Tang J. Microbiome in the urinary system—a review. *AIMS Microbiol*. 2017;3(2):143.
43. Aragón IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuño MI, Castillo E, Del Moral JSG, Gómez-Millán J, et al. The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *Eur Urol Focus*. 1 gener 2018;4(1):128-38.
44. Cheng Y, Chen Z, Gawthorne JA, Mukerjee C, Varetas K, Mansfield KJ, et al. Detection of intracellular bacteria in exfoliated urothelial cells from women with urge incontinence. 2016;74:67.

45. Alhabardi SM, Edris S, Bahieldin A, Al-Hindi RR. The composition and stability of the vaginal microbiome of healthy women. *JPMA J Pak Med Assoc*. 1 agost 2021;71(8):2045-51.
46. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UME, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med*. 2 maig 2012;4(132).
47. Muhleisen AL, Herbst-Kralovetz MM. Menopause and the vaginal microbiome. *Maturitas*. 1 setembre 2016;91:42-50.
48. Greenbaum S, Greenbaum G, Moran-Gilad J, Weintruab AY. Ecological dynamics of the vaginal microbiome in relation to health and disease. *Am J Obstet Gynecol*. 1 abril 2019;220(4):324-35.
49. Cresci GA, Bawden E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr*. 1 desembre 2015;30(6):734-46.
50. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1 desembre 2020;113(12):2019-40.
51. Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med*. 1 gener 2018;32(1):9.
52. Dinan K, Dinan T. Antibiotics and mental health: The good, the bad and the ugly. *J Intern Med*. 12 juliol 2022;
53. Cook ME. Triennial Growth Symposium: a review of science leading to host-targeted antibody strategies for preventing growth depression due to microbial colonization. *J Anim Sci*. juliol 2011;89(7):1981-90.
54. Fusco W, Lorenzo MB, Cintoni M, Porcari S, Rinninella E, Kaitsas F, et al. Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*. 6 maig 2023;15(9):2211.
55. Gupta K, Tappiti M, Nazir AM, Koganti B, Memon MS, Aslam Zahid M Bin, et al. Fecal Microbiota Transplant in Recurrent *Clostridium Difficile* Infections: A Systematic Review. *Cureus*. 5 maig 2022;14(5).

56. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 31 gener 2013;368(5):407-15.
57. Braundmeier-Fleming A, Russell NT, Yang W, Nas MY, Yaggie RE, Berry M, et al. Stool-based biomarkers of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Sci Rep*. 18 maig 2016;6.
58. Magruder M, Sholi AN, Gong C, Zhang L, Edusei E, Huang J, et al. Gut uropathogen abundance is a risk factor for development of bacteriuria and urinary tract infection. *Nat Commun*. 1 desembre 2019;10(1).
59. Lewis AL, Gilbert NM. Roles of the vagina and the vaginal microbiota in urinary tract infection: evidence from clinical correlations and experimental models. *GMS Infect Dis*. 26 març 2020;8:Doc02.
60. Cao Z, Sugimura N, Burgermeister E, Ebert MP, Zuo T, Lan P. The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *eBioMedicine*. 23 juny 2022;81:104113.
61. Shareefdeen H, Hill C. The gut virome in health and disease: new insights and associations. *Curr Opin Gastroenterol*. 1 novembre 2022;38(6):549-54.
62. Monleón-getino T, Rodríguez-casado CI, Méndez-viera J. Sample size in metagenomics , a bayesian approach using “ BDSbiost3 ” for R XVI Conferencia Española de Biometría – CEB2017. 2017;(September).
63. Sánchez-Sánchez B, Torres-Lacomba M, Yuste-Sánchez MJ, Navarro-Brazález B, Pacheco-da-Costa S, Gutiérrez-Ortega C, et al. Cultural adaptation and validation of the Pelvic Floor Distress Inventory Short Form (PFDI-20) and Pelvic Floor Impact Questionnaire Short Form (PFIQ-7) Spanish versions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1 setembre 2013;170(1):281-5.
64. Stamm WE, Hooton TM. Management of urinary tract infections in adults. *N Engl J Med*. 28 octubre 1993;329(18):1328-34.

65. Pigrau C. Infecciones del tracto urinario nosocomiales. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. noviembre 2013;31(9):614-24.
66. DNA Genotek - Vaginal Microbiome DNA/RNA Collection Kit [Internet]. [citat 21 juliol 2022]. Disponible a: <https://www.dnagenotek.com/us/products/collection-microbiome/omnigene-vaginal/OMR-130.html>
67. MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit Manual.
68. Stool Sample Collection & Stabilization Kit | Canvax Biotech [Internet]. [citat 21 juliol 2022]. Disponible a: <https://lifescience.canvaxbiotech.com/product/stool-sample-collection-stabilization-kit/>
69. HigherPurity™ Stool DNA Extraction Kit | Canvax Biotech [Internet]. [citat 21 juliol 2022]. Disponible a: <https://lifescience.canvaxbiotech.com/product/higherpurity-stool-dna-isolation-kit/>
70. Cuantificación fluorimétrica Qubit - ES [Internet]. [citat 18 agost 2024]. Disponible a: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>
71. Espectrofotómetros de microvolumen NanoDrop - ES [Internet]. [citat 18 agost 2024]. Disponible a: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/instruments/nanodrop.html>
72. TruSeq DNA PCR-Free | Simple prep for sequencing complex genomes [Internet]. [citat 18 agost 2024]. Disponible a: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-dna-pcr-free.html>
73. Sample Quality Control, Electrophoresis, Bioanalyzer | Agilent [Internet]. [citat 18 agost 2024]. Disponible a: <https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-instrument/2100-bioanalyzer->

- instrument-228250?srsId=AfmBOop79N7QFdMH5V9BtLjp1THe-SJOQM8288aTkybWMp1skw2aI73d
74. NovaSeq 5000 System from Illumina | Biocompare.com [Internet]. [citat 18 agost 2024].
Disponibile a: <https://www.biocompare.com/23967-Next-Generation-Sequencers/11182183-NovaSeq-5000-System/>
 75. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. [citat 5 novembre 2023]. Disponible a:
<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 76. NCBI [Internet]. [citat 3 gener 2024]. Homo sapiens genome assembly GRCh38.p14.
Disponibile a: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/assembly/GCF_000001405.40/
 77. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 4 març 2009;10(3):R25.
 78. Langmead B, Wilks C, Antonescu V, Charles R. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics.* 1 febrer 2019;35(3):421-32.
 79. Paytuví A, Battista E, Scippacercola F, Cigliano RA, Sanseverino W. GAIA: an integrated metagenomics suite [Internet]. *bioRxiv*; 2019 [citat 24 agost 2023]. p. 804690. Disponible a: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/804690v1>
 80. Tithi SS, Aylward FO, Jensen RV, Zhang L. FastViromeExplorer: a pipeline for virus and phage identification and abundance profiling in metagenomics data. *PeerJ.* 12 gener 2018;6:e4227.
 81. Nayfach S, Pérez-Espino D, Call L, Low SJ, Sberro H, Ivanova NN, et al. Metagenomic compendium of 189,680 DNA viruses from the human gut microbiome. *Nat Microbiol.* juliol 2021;6(7):960-70.
 82. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 4 gener 2018;46(D1):D708-17.

83. UniProt [Internet]. [citat 18 agost 2024]. Disponible a: <https://www.uniprot.org/>
84. Suzek BE, Wang Y, Huang H, McGarvey PB, Wu CH. UniRef clusters: a comprehensive and scalable alternative for improving sequence similarity searches. *Bioinformatics*. 15 març 2015;31(6):926-32.
85. Buchfink B, Reuter K, Drost HG. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nat Methods*. abril 2021;18(4):366-8.
86. Sequeira JC, Rocha M, Alves MM, Salvador AF. UPIMAPI, reCOGnizer and KEGGCharter: Bioinformatics tools for functional annotation and visualization of (meta)-omics datasets. *Comput Struct Biotechnol J*. 1 gener 2022;20:1798-810.
87. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*. 22 abril 2013;8(4):e61217.
88. Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*. 17 desembre 2018;6(1):226.
89. Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJM. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol*. octubre 2001;67(10):4399-406.
90. The Quarterly Review of Biology 1981-03: Vol 56 Iss 1 [Internet]. University of Chicago, acting through its Press; 1981 [citat 10 abril 2023]. 133 p. Disponible a: http://archive.org/details/sim_quarterly-review-of-biology_1981-03_56_1
91. Ortiz-Burgos S. Shannon-Weaver Diversity Index. En: Kennish MJ, editor. *Encyclopedia of Estuaries* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016 [citat 18 agost 2024]. p. 572-3. Disponible a: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8801-4_233
92. Guíasu RC, Guíasu S. Weighted Gini-Simpson Quadratic Index of Biodiversity for Interdependent Species. *Nat Sci*. 25 abril 2014;6(7):455-66.

93. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, et al. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-2. 1 gener 2012;
94. Shi P, Zhang A, Li H. Regression analysis for microbiome compositional data. *Ann Appl Stat.* juny 2016;10(2):1019-40.
95. Venables WN, Ripley BD. Modern Applied Statistics with S [Internet]. New York, NY: Springer; 2002 [citat 10 abril 2023]. (Chambers J, Eddy W, Härdle W, Sheather S, Tierney L. Statistics and Computing). Disponible a: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-21706-2>
96. Lin H, Eggesbø M, Peddada SD. Linear and nonlinear correlation estimators unveil undescribed taxa interactions in microbiome data. *Nat Commun.* 23 agost 2022;13(1):4946.
97. Lin H, Peddada SD. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun.* 14 juliol 2020;11(1):3514.
98. Calle ML, Pujolassos M, Susin A. coda4microbiome: compositional data analysis for microbiome cross-sectional and longitudinal studies. *BMC Bioinformatics.* 6 març 2023;24(1):82.
99. France MT, Ma B, Gajer P, Brown S, Humphrys MS, Holm JB, et al. VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. *Microbiome.* 23 novembre 2020;8(1):166.
100. The Gene Ontology Consortium, Aleksander SA, Balhoff J, Carbon S, Cherry JM, Drabkin HJ, et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics.* 2 maig 2023;224(1):iyad031.
101. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 4 gener 2017;45(D1):D353-61.

102. Korotkevich G, Sukhov V, Budin N, Shpak B, Artyomov MN, Sergushichev A. Fast gene set enrichment analysis [Internet]. bioRxiv; 2021 [citat 19 febrer 2024]. p. 060012.
Disponible a: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/060012v3>
103. Morsli M, Gimenez E, Magnan C, Salipante F, Huberlant S, Letouzey V, et al. The association between lifestyle factors and the composition of the vaginal microbiota: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1 octubre 2024;43(10):1869-81.
104. Aguiar TBL, Santos APB, Vieira KH, Aguiar TBL, Santos APB, Vieira KH. Relationship between eating habits, body weight, and intestinal health in adults. *Enferm Actual Costa Rica* [Internet]. dezembro 2023 [citat 22 setembre 2024];(45). Disponible a: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1409-45682023000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en
105. Morrill S, Gilbert NM, Lewis AL. Gardnerella vaginalis as a Cause of Bacterial Vaginosis: Appraisal of the Evidence From in vivo Models. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:168.
106. Sequencing Quality Scores [Internet]. [citat 19 gener 2025]. Disponible a: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html>
107. Worby CJ, Olson BS, Dodson KW, Earl AM, Hultgren SJ. Establishing the role of the gut microbiota in susceptibility to recurrent urinary tract infections. *J Clin Invest*. 132(5):e158497.
108. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*. 1 febrer 2018;11(1):1-10.
109. Guarner F. Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterol Hepatol*. 1 març 2011;34(3):147-54.
110. De Filippis F, Paparo L, Nocerino R, Della Gatta G, Carucci L, Russo R, et al. Specific gut microbiome signatures and the associated pro-inflammatory functions are linked to

- pediatric allergy and acquisition of immune tolerance. *Nat Commun.* 13 octubre 2021;12:5958.
111. Forbes JD, Chen C yu, Knox NC, Marrie RA, El-Gabalawy H, de Kievit T, et al. A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases—does a common dysbiosis exist? *Microbiome.* 13 desembre 2018;6:221.
 112. Samuthpongton C, Nopsopon T, Pongpirul K. Gut microbiome diversity measures for metabolic conditions: a systematic scoping review [Internet]. *medRxiv*; 2021 [citat 9 juny 2024]. p. 2021.06.25.21259549. Disponible a:
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.06.25.21259549v1>
 113. Aya V, Jimenez P, Muñoz E, Ramírez JD. Effects of exercise and physical activity on gut microbiota composition and function in older adults: a systematic review. *BMC Geriatr.* 12 juny 2023;23(1):364.
 114. Magruder M, Edusei E, Zhang L, Albakry S, Satlin MJ, Westblade LF, et al. Gut commensal microbiota and decreased risk for Enterobacteriaceae bacteriuria and urinary tract infection. *Gut Microbes.* 12(1):1805281.
 115. Hiippala K, Barreto G, Burrello C, Diaz-Basabe A, Suutarinen M, Kainulainen V, et al. Novel *Odoribacter splanchnicus* Strain and Its Outer Membrane Vesicles Exert Immunoregulatory Effects in vitro. *Front Microbiol.* 12 novembre 2020;11:575455.
 116. Rojas-Velázquez L, Morán P, Serrano-Vázquez A, Portillo-Bobadilla T, González E, Pérez-Juárez H, et al. The regulatory function of *Blastocystis* spp. on the immune inflammatory response in the gut microbiome. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2022 [citat 4 febrer 2024];12. Disponible a:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.967724>
 117. Alhabardi SM, Edris S, Bahieldin A, Al-Hindi RR. The composition and stability of the vaginal microbiome of healthy women. *JPA J Pak Med Assoc.* agost 2021;71(8):2045-51.

118. Lehtoranta L, Ala-Jaakkola R, Laitila A, Maukonen J. Healthy Vaginal Microbiota and Influence of Probiotics Across the Female Life Span. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 [citat 4 febrer 2024];13. Disponible a:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.819958>
119. Chen X, Lu Y, Chen T, Li R. The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 7 abril 2021;11:631972.
120. Park SY, Lee ES, Lee SR, Kim SH, Chae HD. Vaginal Microbiome Is Associated With Vulvodynia, Vulvar Pain Syndrome: A Case-Control Study. *Sex Med*. 27 febrer 2021;9(2):100314.
121. Raz R, Stamm WE. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N Engl J Med*. 9 setembre 1993;329(11):753-6.
122. Stamm WE, Raz R. Factors contributing to susceptibility of postmenopausal women to recurrent urinary tract infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. abril 1999;28(4):723-5.
123. Balzaretto S, Taverniti V, Rondini G, Marcollegio G, Minuzzo M, Remagni MC, et al. The vaginal isolate *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760) is suitable for oral administration. *Front Microbiol*. 15 setembre 2015;6:952.
124. Lin YP, Chen WC, Cheng CM, Shen CJ. Vaginal pH Value for Clinical Diagnosis and Treatment of Common Vaginitis. *Diagnostics*. 27 octubre 2021;11(11):1996.
125. Xu Y, Moser C, Al-Soud WA, Sørensen S, Høiby N, Nielsen PH, et al. Culture-Dependent and -Independent Investigations of Microbial Diversity on Urinary Catheters. *J Clin Microbiol*. desembre 2012;50(12):3901-8.
126. Lin S, Zhang B, Lin Y, Lin Y, Zuo X. Dysbiosis of Cervical and Vaginal Microbiota Associated With Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Front Cell Infect Microbiol*. 14 febrer 2022;12:767693.

127. Chen Y, Hong Z, Wang W, Gu L, Gao H, Qiu L, et al. Association between the vaginal microbiome and high-risk human papillomavirus infection in pregnant Chinese women. *BMC Infect Dis.* 1 agost 2019;19:677.
128. Khiabani SA, Haghighat S, Khosroshahi HT, Asgharzadeh M, Kafil HS. Clostridium species diversity in gut microbiota of patients with renal failure. *Microb Pathog.* agost 2022;169:105667.
129. Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Factories.* desembre 2020;19(1):1-24.
130. Vitali B, Pugliese C, Biagi E, Candela M, Turrone S, Bellen G, et al. Dynamics of Vaginal Bacterial Communities in Women Developing Bacterial Vaginosis, Candidiasis, or No Infection, Analyzed by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol.* setembre 2007;73(18):5731-41.
131. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci.* 15 març 2011;108(supplement_1):4680-7.
132. Balaouras G, Kostoulas P, Mikos T, Balaouras D, Chitzios D. The Study of Microbiome of the Female Genital Area in Relation to Pelvic Floor Dysfunction: A Systematic Review. *Int Urogynecology J* [Internet]. 11 juny 2024 [citat 25 juny 2024]; Disponible a: <https://doi.org/10.1007/s00192-024-05821-4>
133. Liang G, Bushman FD. The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* agost 2021;19(8):514-27.
134. Nhu NTQ, Young VB. The Relationship Between the Microbiome and Antimicrobial Resistance. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 5 desembre 2023;77(Suppl 6):S479-86.

135. Page TH, Smolinska M, Gillespie J, Urbaniak AM, Foxwell BMJ. Tyrosine kinases and inflammatory signalling. *Curr Mol Med*. febrer 2009;9(1):69-85.
136. Radovani B, Gudelj I. N-Glycosylation and Inflammation; the Not-So-Sweet Relation. *Front Immunol*. 27 juny 2022;13:893365.
137. Schoeler M, Ellero-Simatos S, Birkner T, Mayneris-Perxachs J, Olsson L, Brolin H, et al. The interplay between dietary fatty acids and gut microbiota influences host metabolism and hepatic steatosis. *Nat Commun*. 1 setembre 2023;14(1):5329.
138. Petriello MC, Hoffman JB, Vsevolozhskaya O, Morris AJ, Hennig B. Dioxin-like PCB 126 increases intestinal inflammation and disrupts gut microbiota and metabolic homeostasis. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. novembre 2018;242(Pt A):1022-32.
139. Cook-Libin S, Sykes EME, Kornelsen V, Kumar A. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun*. 6 setembre 2022;90(10):e00223-22.
140. Jia W, Xie G, Jia W. Bile acid–microbiota cross-talk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 11 octubre 2017;15(2):111.

Annex

Nota Informativa para los pacientes:

Barcelona, x de xxxx de 20xx

Título del estudio: Papel del microbioma intestinal y genital en las infecciones urinarias recurrentes.

Código del estudio: PI19/00427

Investigador principal: Servicio de Microbiología,

Telf: 935537297

Centro: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un proyecto de investigación en el que se le invita a participar.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

Debe saber que su participación es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con el personal sanitario.

Descripción general del proyecto

El objetivo de este proyecto es determinar la importancia de los microorganismos presentes en el tubo digestivo y concretamente los presentes en las heces y los presentes en el área genital, en las infecciones urinarias recurrentes.

Si usted decide participar se le solicitará una muestra de heces, un exudado vaginal y una muestra de orina.

Se le solicitará su consentimiento para que con la muestra de orina se realice un urinocultivo y de las muestras de heces y exudado vaginal se realice un estudio del microbioma por técnicas de secuenciación..

Una vez completado el estudio su muestra se desechará, y no se recogerán más datos ni muestras.

Beneficios y riesgos derivados de su participación

Su participación en este proyecto carece de riesgos. Asimismo, debe saber que usted no obtendrá ningún beneficio de su participación en este proyecto; pero de los resultados del mismo podría derivarse un beneficio para la sociedad.

Confidencialidad

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Le garantizamos que su intimidad será estrictamente respetada y que los resultados obtenidos de este procedimiento nunca irán acompañados de datos o informaciones que puedan revelar su identidad a terceros.

Compensación económica:

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto ni obtendrá compensación económica alguna.

Si tiene alguna duda o desea recibir más información, puede contactar con Dr. Ferran Navarro.

Hoja de consentimiento informado:

Yo (nombre y apellidos).....

Declaro que el Dr. Ferran Navarro del Servicio de Microbiología me ha explicado acerca del proyecto de investigación titulado "Papel del microbioma intestinal i genital en las infecciones urinarias recurrentes." y declaro que:

1. He recibido información clara y sencilla, oral y escrita, sobre mi participación en el proyecto.
2. He entendido las explicaciones del equipo médico sobre este proyecto y porqué se hace.
3. Me han pedido permiso para que los resultados puedan ser utilizados para investigación.
4. Me han asegurado que mis datos personales serán mantenidos en la más absoluta confidencialidad.
5. Puedo retirar este consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones, comunicando esta decisión al equipo médico.

Por lo cual autorizo de forma libre y voluntaria participar en este proyecto

.....,de.....de 20XX.

Firma del paciente:

Nombre:

Fecha:

Firma del investigador:

Nombre:

Fecha:

MOSTRES

Etiqueta

DATA: / /

**ESTUDI DEL PAPER DEL MICROBIOMA VAGINAL I
INTESTINAL EN LA INFECCIÓ URINÀRIA DE REPETICIÓ**

EL PACIENT HA ESTAT INFORMAT

DATA: / /

NOTA INFORMATIVA ENTREGADA I SIGNADA ☐

AL PACIENT SE LI HA REALIZAT L'ENQUESTA

DATA: / /

ENQUESTA CUMPLIMENTADA I SIGNADA ☐

AL PACIENT SE LI HAN RECOLLIT LES MOSTRES

DATA: / /

ORINA ☐

EXUDAT VAGINAL ☐

FEMTA ☐

RECOLLIDA PER:

En cas de dubte us podeu adreçar a:
Dr. Ferran Navarro (ext. 7290; fnavarrior@santpau.cat)
Dra. Elisenda Miró (ext. 7577; emiro@santpau.cat)
Adrià Cruells (ext.7570; acruells@santpau.cat)

PETICIÓ

Etiqueta

DATA: / /

**ESTUDI DEL PAPER DEL MICROBIOMA VAGINAL I
INTESTINAL EN LA INFECCIÓ URINÀRIA DE REPETICIÓ**

ES SOL·LICITA L'ESTUDI DEL MICROBIOMA URINARI ☐

ES SOL·LICITA L'ESTUDI DEL MICROBIOMA VAGINAL ☐

ES SOL·LICITA L'ESTUDI DEL MICROBIOMA INTESTINAL ☐

En cas de dubte us podeu adreçar a:
Dr. Ferran Navarro (ext. 7290; fnavarrior@santpau.cat)
Dra. Elisenda Miró (ext. 7577; emiro@santpau.cat)
Adrià Cruells (ext.7570; acruells@santpau.cat)

ENCUESTA

Etiqueta

FECHA: / /

Datos personales

Año de nacimiento: / /

Edad (años):

Peso (Kg):

Talla (m):

Número de hijos:

Nivel de estudios: Ninguno E. Primaria E. Secundaria Obligatoria E. Superiores

Tipo de dieta: Sin restricciones Vegetariana Vegana Sin gluten Sin lactosa Hiperprotéica Anticándida

Ingesta hídrica (litros/día):

Antecedentes en Infección urinaria

Edad inicio de ITUr (años):

Nº ITUs/año:

ITU postcoital:

Urgencia miccional: Sí / No

Frecuencia miccional diurna: <1h / 1-2h / 2-4h / >4h

Estreñimiento: Sí / No Nº deposiciones:

Incontinencia urinaria: Sí / No Tipo:

Antecedentes en ginecología

Nº partos vaginales:

Nº cesáreas:

Fecha de última regla:

Días tras inicio de última regla:

Método íntimo más habitual (últimos 6 meses): Tampón Compresa Copa Esponja

Menopausia: Sí / No

Cirugía pélvica previa: Ninguna Histerectomía IQ anti-incontinencia IQ prolapso Otras

Prolapso órganos pélvicos: Ninguno Cistocele POP medio Rectocele

Vaginitis de repetición (>3 en 6 meses): Sí / No

Patología cervical: Sí / No Desde:

Sexualmente activa: Sí / No

Tipo de relaciones sexuales: Con hombres Con mujeres Con ambos

Frecuencia de las relaciones sexuales: < 1 mes 1-2/mes 1-2/semana 3-4/semana >4/semana

Anticonceptivo (habitual en últimos 6 meses): Ninguno Preservativo Espermicida Hormonal DIU Otros:

Higiene genitales externos con jabón: No Sí, con jabón normal Sí, con jabón íntimo

Lavados vaginales: Sí / No

Ropa interior de algodón: Sí / No

Ropa interior ajustada: Sí / No

Tratamiento previo con vacuna: Sí / No

Terapia antiestrogénica: Sí / No

Tratamiento hormonal sustitutivo sistémico: Sí / No Durante:

Tratamiento estrógeno local: Sí / No Durante:

Tratamiento previo suplementos arándanos: Sí / No Durante:

Tratamiento previo con D manosa: Sí / No Durante:

Tratamiento antibiótico profiláctico previo: Sí / No Tipo: Durante:

Tratamiento probiótico sistémico: Sí / No Tipo: Durante:

Tratamiento probiótico vaginal: Sí / No Tipo: Durante:

Tratamiento endovaginal: Sí / No Tipo: Durante:

Otros tratamientos preventivos ITU: Sí / No Tipo: Durante:

REALIZADA PER:

Incloure aquest full a la bossa amb les mostres i enviar el paquet al laboratori de Microbiologia*

DISFUNCIÓN SUELO PÉLVICO

*Tener en cuenta los síntomas de los últimos 3 meses

Etiqueta

FECHA: / /

- | | | | | | | |
|--|----|----|------|---------|---------------|-------|
| 1. Habitualmente, ¿siente usted presión en la parte baja del abdomen? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 2. Habitualmente, ¿tiene usted una sensación de pesadez en la zona de la pelvis? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 3. Habitualmente, ¿siente usted un "abultamiento" o algo que sale hacia fuera que puede tocar o ver en la zona de su vagina? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 4. ¿Alguna vez tiene que empujar sobre su vagina o alrededor de su recto para poder defecar o para acabar de defecar? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 5. Habitualmente, ¿tiene usted una sensación de no llegar a vaciar completamente su vejiga? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 6. ¿Alguna vez tiene usted que empujar con los dedos un "abultamiento" en la zona de la vagina para iniciar o completar la micción? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 7. ¿Tiene usted la sensación de tener que empujar mucho para defecar? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 8. ¿Tiene usted la sensación de que no ha vaciado completamente el intestino tras haber defecado? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 9. Habitualmente, ¿tiene usted pérdidas fecales involuntarias cuando sus heces son sólidas? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 10. Habitualmente, ¿tiene usted pérdidas fecales involuntarias cuando sus heces son muy blandas o líquidas? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 11. Habitualmente, ¿tiene usted pérdida involuntaria de gases? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 12. Habitualmente, ¿siente usted dolor al defecar? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 13. Habitualmente, ¿tiene usted una fuerte sensación de urgencia de forma que tiene que correr al baño para defecar? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 14. ¿Alguna vez parte de su intestino sobresale por el ano mientras usted defeca o al acabar de defecar? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 15. Habitualmente, ¿orina con frecuencia? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 16. Habitualmente, ¿experimenta usted pérdidas involuntarias de orina asociadas a una sensación de urgencia, es decir, una fuerte sensación de tener que ir al baño a orinar? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 17. Habitualmente, ¿tiene usted pérdidas de orina al toser, estornudar o reír? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 18. Habitualmente, ¿tiene usted la sensación de perder pequeñas cantidades de orina (es decir, gotas)? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 19. Habitualmente, ¿tiene usted dificultades para vaciar su vejiga? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |
| 20. Habitualmente, ¿siente usted dolor o molestia en la parte baja del abdomen o en la zona genital? Si la respuesta es sí, ¿cuánto le molesta? | Sí | No | Nada | Un poco | Moderadamente | Mucho |