
This is the **published version** of the bachelor thesis:

Pascual Lopez, Irene; Muñoz-Batet, Carmen, dir.; Navarro Risueño, Ferran, dir.
Relación entre la microbiota intestinal y genital con las infecciones urinarias
recurrentes en mujeres. 2020. 32 pàg. (1192 Grau de Medicina)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/232824>

under the terms of the  license

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**RELACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y
GENITAL CON LAS INFECCIONES URINARIAS
RECURRENTE EN MUJERES.**

Autora: Irene Pascual López

Tutor: Dr Ferran Navarro

Grado Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona – UD Sant Pau

Mayo 2020

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a mi tutor, el Dr. Ferran Navarro, quien no ha escatimado en tiempo y dedicación para ayudarme a entender mejor el tema que tratamos en este trabajo y me ha apoyado en su realización desde el primer momento.

Me gustaría agradecer también al Dr. Ignasi Gigh por sus consejos en relación a la parte estadística del trabajo.

Finalmente agradecer a mi pareja, familia y amigos el apoyo brindado.

Abstract

Background and hypothesis: Urinary tract infections (UTIs) are a very prevalent health problem that affect more than 150 million people, mainly women, with a recurrence rate greater than 30%. The intestinal microbiota forms a delicate balance and its different composition could be a predisposing factor for the recurrence of urinary tract infections. In this study we propose to explore the existing differences in the composition of the intestinal and vaginal microbiota that can explain the predisposition to suffer recurrent UTIs (UTIr) in a certain group of women.

Methodology: Case-controls observational study in which vaginal exudate, urine and stool samples will be obtained from 100 women with UTI and 200 women without UTI. These samples will be analysed at the metataxonomic and metabolomic levels and using bioinformatics tools.

Applicability: With these data it is expected to have a greater base knowledge that lead us to reach new and more specific treatments against UTI based on microbiology.

Resumen

Antecedentes e hipótesis: Las infecciones urinarias (ITU) son un problema de salud muy prevalente que afecta a más de 150 millones de personas, principalmente mujeres, en las que se observa una tasa de recurrencias mayor al 30%. La microbiota intestinal forma un delicado equilibrio y su diferente composición podría ser un factor predisponente para la recurrencia de infecciones urinarias. En este estudio nos proponemos explorar las diferencias existentes en la composición de la microbiota intestinal y vaginal que expliquen la predisposición a sufrir ITU recurrentes (ITUr) en un determinado grupo de mujeres.

Metodología: Estudio observacional de tipo casos-controles en que se obtendrán muestras de heces, exudado vaginal y orina de 100 mujeres con ITUr y 200 mujeres sin ITUr. Estas muestras serán analizadas a nivel metataxonómico y metabolómico mediante herramientas bioinformáticas.

Aplicabilidad: Con estos datos se espera tener una base sobre la que investigar nuevos tratamientos para erradicar las ITUr basados en la modulación de la microbiota.

Resum

Antecedents i hipòtesis: Les infeccions urinàries (ITU) són un problema de salut molt prevalent que afecta més de 150 milions de persones, principalment dones, en què s'observa una taxa de recurrències major al 30%. La microbiota intestinal forma un delicat equilibri i la seva diferent composició podria ser un factor predisponent per a la recurrència d'infeccions urinàries. En aquest estudi ens proposem explorar les diferències existents en la composició de la microbiota intestinal i vaginal que expliquin la predisposició a patir ITU recurrents (ITUr) en un determinat grup de dones.

Metodologia: Estudi observacional de tipus casos-controls en què s'obtindran mostres de femta, exsudat vaginal i orina de 100 dones amb ITUr i 200 dones sense ITUr. Aquestes mostres seran analitzades a nivell metataxonòmic i metabolòmic i mitjançant eines bioinformàtiques.

Aplicabilitat: Amb aquestes dades s'espera tenir una base sobre la qual investigar nous tractaments per a erradicar les ITUr basats en la modulació de la microbiota.

ABREVIACIONES

ACO: Anticonceptivos

ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosómico

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CI: Consentimiento Informado

DIU: Dispositivo Intrauterino

IMC: Índice de Masa Corporal

ITU: Infección urinaria

ITUr: Infección urinaria recurrente

MALT: Tejido Linfoide Asociado a Mucosas

OTU: Operational Taxonomic Unit

TMF: Trasplante de Microbiota Fecal

UPEC: *Escherichia coli* Uropatógeno

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. ANTECEDENTES | 1 |
| Factores de riesgo para la presentación de infecciones urinarias..... | 1 |
| Relación con la microbiota intestinal | 2 |
| Relación con la microbiota vaginal..... | 3 |
| Tratamiento actual de las infecciones urinarias | 4 |
| Justificación del estudio | 5 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 5 |
| 3. OBJETIVOS | 5 |
| Objetivo principal..... | 5 |
| Objetivos secundarios | 5 |
| 4. METODOLOGÍA..... | 5 |
| Diseño del estudio | 5 |
| Población del estudio | 6 |
| Tamaño de la muestra | 7 |
| Procedimiento..... | 7 |
| Manejo y análisis de los datos..... | 9 |
| 5. PLAN DE TRABAJO – CRONOGRAMA..... | 10 |
| 6. RESULTADOS QUE SE ESPERA OBTENER. APLICABILIDAD. | 11 |
| 7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO | 12 |
| 8. PLAN DE DIFUSIÓN | 13 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 13 |
| ANEXO..... | 16 |

| | |
|---|----|
| Figura 1. Factores de riesgo relacionados con la recurrencia de las infecciones urinarias.. | 16 |
| Figura 2. Diagrama de prevalencia de los distintos patógenos causantes de ITU. | 17 |
| Tabla 1. Microorganismos que componen la microbiota vaginal de mujeres sanas. | 17 |
| Tabla 2. Causas urológicas de recaída o persistencia de bacteriuria en la mujer..... | 18 |
| Figura 3. Diagrama del procedimiento de estudio | 18 |
| Tabla 3. Cuestionario sobre hábitos de vida | 19 |
| Tabla 4. Subgrupos de estudio | 20 |
| Tabla 5. Cronograma del estudio | 21 |
| Escrito 1. Hoja de información a la paciente | 22 |
| Escrito 2. Consentimiento informado | 24 |

1. ANTECEDENTES

La infección del tracto urinario (ITU) es la respuesta inflamatoria del urotelio a la invasión bacteriana, generalmente asociada a bacteriuria y piuria y que suele ir acompañada de manifestaciones clínicas como urgencia y frecuencia miccional y disuria¹. Las infecciones urinarias son de las infecciones bacterianas más comunes en el mundo, afectando a más de 150 millones de personas anualmente y, a pesar de una terapia antibiótica eficaz, en mujeres, un 30-50% de las pacientes sufren recurrencias².

Factores de riesgo para la presentación de infecciones urinarias

La incidencia de ITU es significativamente mayor en las mujeres que en los hombres como consecuencia principalmente de sus diferencias anatómicas³. La uretra es un portal para la salida de orina, pero también permite la entrada de microbios, incluidos los patógenos, en el tracto urinario. La distancia más corta a la vejiga en mujeres hace posible que los colonizadores bacterianos lleguen a ella más fácilmente antes de que se eliminen por micción. Además, la apertura uretral en las mujeres es próxima a la cavidad vaginal y el recto, que albergan grandes comunidades bacterianas⁴.

La frecuencia de presentación de las ITU también se ha visto relacionada con otros factores de riesgo como la obstrucción del tracto urinario, la micción incompleta, la anatomía estructural alterada, la frecuencia de las relaciones sexuales, el uso de espermicidas (los cuales alteran el pH vaginal reduciendo la población de *Lactobacilos*), la presentación de niveles bajos de estrógenos vaginales, así como un historial de infecciones urinarias en una familiar de primer grado, lo cual sugiere una posible predisposición genética a sufrir ITUr^{4,5}. **Anexo Figura 1**

Etiopatogenia de las ITU

Las infecciones urinarias pueden ser causadas por bacterias, virus y por ciertos hongos. El agente causal más común para las infecciones urinarias, tanto complicadas como no complicadas, es *Escherichia coli uropatógena* (UPEC), la cual representa más del 75% de las infecciones. Otros

agentes causales de ITU en pacientes sin factores predisponentes son *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, y *Proteus mirabilis*. Por otro lado, se han encontrado en personas con factores predisponentes para ITU las siguientes etiologías: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Candida albicans*⁶. **Anexo**

Figura 2

Relación con la microbiota intestinal

Como se ha comentado, *E. coli* es el principal responsable de ITU. En diversos estudios se ha demostrado la pertenencia de dicho uropatógeno al colon⁷ y se ha podido hallar simultáneamente la misma cepa en el colon y la orina de los pacientes con ITU⁸. Es decir, parece existir una relación entre la etiopatogenia de las ITU y la composición de la microbiota intestinal.

Hay ciertos factores que pueden alterar dicha microbiota, siendo los más importantes la dieta y la ingesta de antibióticos. Dadas las diferencias interindividuales y temporales de este ecosistema es difícil definir una microbiota normal, aunque se considera más saludable cuanto mayor sea su diversidad y equilibrio entre especies. En una persona adulta, el tracto gastrointestinal puede albergar entre 500 y 1000 especies de microorganismos, siendo los mayoritarios los filos *Bacterioides* (25%), *Firmicutes* (60%), seguidos de *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. Otros microorganismos que podemos encontrar son *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetas*, hongos, arqueas, protozoos y virus. Se ha establecido también el ratio *Firmicutes/Bacterioides* como parámetro para evaluar el equilibrio de la microbiota intestinal y su funcionalidad⁹.

En ciertos estudios se ha establecido que el riesgo de infecciones urinarias en mujeres parece aumentar cuando la abundancia relativa respecto al resto de flora intestinal de *Enterobacteriaceae* está sobrerrepresentada y la de *Lactobacilos* infrarrepresentada. También se ha encontrado una cantidad de *Escherichia* y *Enterococcus* muy superior en la microbiota intestinal de pacientes con ITU comparado con pacientes sin ITU⁷ y se ha podido determinar una abundancia relativa de

Escherichia en colon superior al 1% como factor de riesgo independiente de bacteriuria y ITU en pacientes trasplantados de riñón.

Estos resultados apoyan el eje microbiota intestinal-ITU y nos sugieren que la modulación de la microbiota intestinal podría ser una potencial estrategia terapéutica para prevenir las ITU.

Relación con la microbiota vaginal

Aunque las infecciones del tracto urinario inferior no son propiamente genitales, la colonización vaginal por parte de las bacterias causales, cuyo reservorio es el intestino grueso, parece ser un paso intermedio esencial en su migración a la región periuretral y, posteriormente, a la vejiga¹⁰.

La microbiota vaginal varía en función del momento vital. En niñas la colonización es escasa y posteriormente, la pubertad provoca un aumento de la humedad y del aporte de nutrientes que facilita la colonización por *Lactobacilos* (*L. Cispatus*, *L.jerseni*, *L.gasseru*, *L.iners*), los cuales, mediante su producción de ácido láctico y peróxido de hidrógeno, producen un ambiente pH ácido y protege de los uropatógenos. Tras la menopausia se establece una disminución de los *Lactobacilos* y aumentan las infecciones urinarias, causadas fundamentalmente por enterobacterias¹¹.

Se ha visto que su composición guarda también relación la composición de la microbiota intestinal. En la **tabla 1 del Anexo** se presenta una relación de los microorganismos que se detectan con regularidad en la vagina de mujeres sanas; la mayoría son típicos del hábitat intestinal, lo que sugiere que el tracto entérico podría actuar como reservorio de dichos microorganismos. Sin embargo, las frecuencias relativas son muy distintas a las encontradas en la porción final del tubo digestivo; los *Lactobacilos* son dominantes en la vagina, hasta el punto de ser prácticamente exclusivos en muchos casos, mientras que son minoritarios en el intestino, no siempre aparecen, y cuando lo hacen su proporción nunca es superior al 1%¹⁰.

Tratamiento actual de las infecciones urinarias

Las pacientes que padecen ITU sintomáticas son generalmente tratadas con antibióticos, que resuelven gran parte de las infecciones en primera instancia. No obstante, en un 35% de las mujeres la infección reaparece en diversas ocasiones, haciéndose recurrente¹. En los últimos años se está observando un aumento en la tasa de resistencias a antibióticos por parte de los uropatógenos. Además, los antibióticos presentan la desventaja de alterar mucho la microbiota, dejando despoblados algunos nichos y facilitando así su colonización por patógenos. Todo ello está elevando la importancia de encontrar nuevos tratamientos para luchar contra estas infecciones^{3,6}.

Algunos ejemplos de terapias contra las ITUr son:

- Profilaxis antibiótica mediante una dosis nocturna durante 6-12 meses, con la cual se ha comprobado una disminución de la recurrencia del 95% al comparar con la experiencia previa o con el uso de placebo, pero no está clara su acción a largo plazo ya que tienden a recurrir al abandonar el tratamiento¹.
- Profilaxis antibiótica postcoital. Ésta se sugiere cuando existe una asociación temporal entre la aparición de las ITU y las relaciones sexuales¹.
- Vacuna oral, compuesta por extractos proteicos liofilizados de diferentes cepas de UPEC, en estudio¹.
- Reemplazo estrogénico en la mujer postmenopáusica. Este tratamiento se basa en que los estrógenos parecen favorecer la colonización vaginal por *Lactobacilos*, los cuales protegen frente la colonización por uropatógenos¹.
- Vacuna vaginal: Se fundamenta en la existencia de tejido MALT en el tracto urogenital, que sería capaz de reconocer antígenos bacterianos y generar una respuesta inmune local, aunque de momento ésta es una terapia en fase de estudio¹.
- Uso de *Lactobacilos* vaginales como probióticos. Prometedor pero sin eficacia probada¹.
- Arándano rojo. Se ha demostrado que inhibe la adherencia de los uropatógenos a las células uroepiteliales¹².

Justificación del estudio

A pesar de todas estas opciones terapéuticas, muchas aún en fase de estudio, las ITUr siguen sin resolverse en muchas ocasiones.

Nosotros nos hemos planteado conseguir una visión más clara de qué factores microbiológicos pueden estar más relacionados con las ITU y centrarnos en ellos para establecer futuros tratamientos para las ITUr.

2. HIPÓTESIS

Basándonos en los hallazgos de los estudios anteriormente citados, nuestra hipótesis es que puede haber diferencias significativas en la composición tanto de la microbiota intestinal como de la vaginal que pueden explicar que un grupo de mujeres esté más predispuesto a sufrir ITUr que otro.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal

Evaluar la composición de la microbiota intestinal y de la microbiota vaginal en pacientes con ITUr y en pacientes sin ITUr para establecer si hay diferencias significativas entre ellas, y en caso de haberlas, determinar cuáles son.

Objetivos secundarios

- Establecer el mejor procedimiento de procesamiento de muestras para el estudio de la microbiota intestinal y vaginal.
- Construir una base de datos sobre la composición de la microbiota intestinal y genital en mujeres con y sin ITU de repetición.

4. METODOLOGÍA

Diseño del estudio

Se propone un estudio observacional analítico de casos-contróles en que se analizará la microbiota de pacientes con y sin ITUr. El estudio será multicéntrico con la participación del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Fundació Puigvert y todos los Centros de Atención Primaria del área

sanitaria de Barcelona.

En base a los objetivos del estudio se utilizará como variable independiente la composición de la comunidad microbiológica intestinal y vaginal y como variable dependiente el padecimiento o no de ITU recurrentes.

Población del estudio

Se considerarán población objeto de estudio las mujeres mayores de 18 años con ITU recurrentes, es decir, que hayan sufrido un mínimo de 3 infecciones urinarias sintomáticas en el último año o 2 en los 6 últimos meses¹.

Con el objetivo de homogeneizar la población de estudio y así evitar sesgos, se establecerán una serie de criterios de inclusión y exclusión:

- Criterios de inclusión:

- Mujeres mayores de 18 años con ITUr (grupo de estudio) y sin ITUr (control), capaces de proporcionar un consentimiento informado para participar en el ensayo.

- Criterios de exclusión:

- Pacientes con alteraciones urológicas que pudieran ser causa de las recurrencias (*Anexo tabla 2*). Para descartarlas se practicará una ecografía renovesical a todas las pacientes con ITUr objeto del estudio, así como una anamnesis dirigida.
- Pacientes que hayan sufrido las ITU mientras estaban hospitalizadas o en las dos semanas siguientes de haberlo sido, así como las pacientes que lleven sondaje vesical en la comunidad¹³.
- Pacientes con tratamiento antibiótico durante el mes previo a la ITU.
- Pacientes con comorbilidades que puedan aumentar el riesgo de ITU: pacientes inmunodeprimidas (fisiológica o farmacológicamente), diabetes mellitus, insuficiencia renal (Creatinina > 2mg/dl) o cualquier enfermedad grave de base.

La población objeto de control serán mujeres mayores de 18 años que cumplan los mismos criterios de inclusión y exclusión y que no cumplan criterios de ITUr.

Tamaño de la muestra

El número de pacientes óptimo para obtener la máxima sensibilidad y la mejor relación coste-beneficios desde el análisis del microbiota se ha medido con el algoritmo desarrollado por Monleon et al (Sample size in metagenomics, a bayesian approach using BDSbiost3 for R)¹⁴, disponible en la plataforma GAIA¹⁵. Esta aproximación, basada sobre la creación de una curva de saturación de la biodiversidad de las muestras (número de OTU encontrado y número de muestras analizadas), nos ha permitido determinar como 30 el número mínimo de pacientes para que el análisis tenga un correcto poder estadístico y una fuerte sensibilidad. Aun así, basándonos en estudios previos sobre microbiota^{8,16}, e intentando obtener la máxima información posible, se ha decidido incluir a 100 pacientes y 200 controles.

Procedimiento

A todas las pacientes que acudan a sus centros de atención primaria, ya sea por revisión o por cualquier consulta médica, vinculada o no a las infecciones urinarias, y que cumplan los criterios de inclusión y exclusión, se les propondrá la realización del estudio. Se les explicará en qué consiste el estudio y, si están de acuerdo, tendrán que firmar el consentimiento informado (*CI en anexo*). Una vez firmado se les hará entrega del material necesario para aportar las muestras de heces, de exudado vaginal y de orina. Diagrama del procedimiento en *Anexo Figura 3*.

- **Toma de muestras:** Las muestras serán tomadas en el momento de presentar infección urinaria en el caso de la población de estudio, siempre antes de empezar cualquier tratamiento antibiótico. En la población control podrán ser tomadas en cualquier momento, pero siempre coincidiendo en el tiempo las tres muestras a tomar. Las muestras serán tomadas por la paciente y serán inmediatamente congeladas en su domicilio hasta que puedan ser transportadas al laboratorio en un plazo máximo de 72h para ser congeladas a -80°C hasta poder ser analizadas.

- Muestra de microbiota intestinal: Se obtendrá mediante una muestra de heces, ya que es el método más sencillo. A pesar de ello sabemos que presenta la desventaja de no representar la totalidad de la microbiota adherida al epitelio intestinal y que las bacterias de los tramos intestinales más superiores pueden estar degradadas impidiendo su correcta detección. Un método alternativo sería la toma de varias biopsias al azar mediante colonoscopia, pero se desestima dicha opción por ser un procedimiento invasivo.
- Muestra de microbiota vaginal: Se tomará una muestra de exudado vaginal mediante la introducción de un hisopo en el canal endocervical por parte de la paciente. Las muestras no podrán ser tomadas durante el periodo perimenstrual, ya que la descarga menstrual tiene un pH próximo a la neutralidad, circunstancia que altera la microbiota vaginal¹⁰.
- Muestra de orina.
- **Cuestionario sobre hábitos de vida (Anexo tabla 3)**: Con el objetivo de tener una base de datos más completa, se les pedirá información a las pacientes sobre algunos hábitos de vida que parecen influir en la composición de la microbiota. Se preguntará sobre los hábitos alimenticios, consumo de alcohol y tabaco, toma de fármacos (antiinflamatorios, antibióticos, antiácidos, ACO)⁸ y uso de dispositivos intrauterinos y espermicidas^{10,12}.
- **Análisis de la muestra**: Para poder tener un cómputo general y muy representativo de la composición de la microbiota en ambos grupos de pacientes, se analizará la muestra mediante tres estrategias.
 - Metataxonomica: Se extrae el ADN total y se secuencian todos los fragmentos de DNA obtenidos. A partir de aquí se analizarán las secuencias de 16s ANDr obtenidas comparándolas con bases de datos de 16s ADNr para saber la composición bacteriana de la microbiota. Además, también se compararán el resto de secuencias obtenidas para poder detectar otros microorganismos que se pudieran escapar a la aproximación mediante el 16s, como la detección de genes implicados en diferentes rutas metabólicas⁹.
 - Metataxonomica de la fracción activa: Los estudios recientes han revelado que habitualmente las bacterias del filo *Bacterioides* están latentes o inactivas, mientras que las

del filo *Firmicutes* son muy activas. Para poder identificar a las bacterias activas es necesario extraer el ARNr 16S de la muestra, transformarlo en ADNc mediante retrotranscripción, y finalmente secuenciarlo⁹.

- Metabolómica: Esta estrategia aborda la identificación y caracterización de los metabolitos desde un punto de vista funcional. La determinación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos se considera uno de los mejores marcadores de actividad microbiana. Se trata de un proceso más complejo, ya que el análisis de heces no solo contiene los productos metabólicos de los microorganismos y de las células epiteliales, sino que también recibe un flujo constante de sustancias con la ingesta de alimentos. Este proceso requerirá de los siguientes pasos: un pre-fraccionamiento de la muestra para separar las bacterias, una lisis celular, un análisis de los perfiles metabolómicos mediante espectrometría de masas de última generación y un análisis comparativo de los datos obtenidos⁹.

Manejo y análisis de los datos

Los datos se procesarán mediante herramientas bioinformáticas en laboratorios especializados en dicha materia. Se analizarán las diferencias encontradas en cada aspecto microbiológico con un límite de significación estadística $p < 0,05$ y un intervalo de confianza del 95%.

Las variables categóricas se expresarán en porcentajes y las cuantitativas mediante la mediana como medida de tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión. Se calculará la diversidad α (riqueza de especies que hay en una determinada comunidad) mediante el índice de Shannon-Weaver^{17,18}.

La comparación de las variables categóricas se realizará mediante un test de Chi-cuadrado χ^2 . Las variables cuantitativas sobre la composición de las microbiotas se analizarán mediante un contraste de hipótesis con T-Student para comparar ambos grupos principales (con y sin ITUr). Se estratificará también el estudio según subgrupos por edad, relaciones sexuales y toma previa de fármacos (*Anexo Tabla 4*). Cuando la n del subgrupo sea menor a 30 se utilizará el test no

paramétrico de Mann-Whitney. Se podrá calcular también la fuerza de asociación mediante Odds Ratio.

Se realizará también un análisis multivariante mediante regresión logística teniendo en cuenta las variables descriptivas de la muestra anteriormente citadas..

5. PLAN DE TRABAJO – CRONOGRAMA. *Anexo tabla 5*

Junio 2020 - Diciembre 2020

Constitución del equipo de investigadores, preparación de materiales y redacción del protocolo final de estudio. Presentación del proyecto al Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC), el cual evalúa la aceptabilidad ética de la investigación, así como determinados aspectos financieros y científicos al respecto, estimando dos meses para su aceptación.

Enero 2021 – Diciembre 2021

Primer contacto y reclutamiento de las participantes para el estudio (pacientes y controles). Explicación y firma del CI. Aporte a las participantes del material necesario para la recolección de muestras. Recolección de las muestras durante todo el año hasta obtención del tamaño muestral planteado inicialmente.

Análisis de las muestras conforme se vayan adquiriendo:

- extracción del DNA, RNA 16s y procesamiento mediante herramientas de secuenciación masiva.
- extracción de metabolitos de la muestra y procesamiento mediante espectrometría de masas.

Enero 2022 - Diciembre 2022

Análisis bioinformático y estadístico de los datos. Puesta en común y discusión de los resultados entre los investigadores. Publicación en revistas urológicas y en revistas sobre la microbiota así como realización de una tesis doctoral.

6. RESULTADOS QUE SE ESPERA OBTENER. APLICABILIDAD.

Actualmente la primera línea de tratamiento para pacientes con ITUr son los antibióticos de larga duración, pero éstos no siempre son eficaces y cuando se abandonan pueden reaparecer las ITU en ciertas pacientes. Además, los antibióticos tienen el inconveniente de alterar las microbiotas intestinal y vaginal y eso puede acarrear problemas como la sobreinfección por otros patógenos. Todo ello aumenta la necesidad de investigar terapias alternativas.

Como se ha podido demostrar con anterioridad, existe una relación entre la microbiota intestinal y vaginal y las ITU, lo cual nos sugiere que la modulación de dicha microbiota podría ser una potencial estrategia terapéutica para erradicar las ITU.

A día de hoy, una de las propuestas potenciales para dicha modulación es el uso de probióticos. Hasta ahora se han utilizado probióticos basados en la aportación de *Lactobacilos*, ya que se sabe que su mayor concentración favorece un ambiente libre de uropatógenos¹⁰. Creemos que la eficacia de los probióticos podría ser mayor si se estableciera con más especificidad qué aporte a la microbiota repercutiría en una disminución significativa de las infecciones urinarias.

Otra potencial terapia basada en la composición de la microbiota como diana terapéutica es el trasplante de microbiota fecal (TMF). Éste consiste en recolonizar el tracto gastrointestinal de las pacientes con heces de personas sanas. Este tratamiento se ha usado hasta ahora para restaurar la flora de personas con infecciones intestinales recurrentes por *Clostridium difficile*. Nuestra hipótesis sobre su uso en pacientes con ITUr se ve apoyada por el hecho de que en los pacientes tratados mediante TMF se produjo también una disminución de las infecciones urinarias^{7,19}. El problema es que esta técnica no está estandarizada a día de hoy y no se sabe qué composición de microbiota podría ser la mejor para frenar las recurrencias de ITU. Sabiendo cuales son las diferencias más significativas en la microbiota de las pacientes con ITUr comparada con las sanas se nos abriría un campo de estudio sobre trasplantes de microbiota fecal más específicos.

Este estudio pretende obtener una base de datos muy completa sobre la composición taxonómica y metabolómica de la microbiota intestinal y vaginal en mujeres adultas con y sin ITUr, pudiendo así determinar qué especies dominan un ambiente intestinal más favorecedor de ITUr y cuáles protegen de ellas. Esta base de datos permitirá extraer numerosas conclusiones para encaminar futuros tratamientos basados en la microbiología.

7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Como en cualquier estudio podemos incurrir en errores aleatorios, que podemos minimizar aumentando el tamaño de la muestra, o sistemáticos, también denominados sesgos. Éstos pueden producirse en cualquier etapa de la investigación y deben tenerse en cuenta para elaborar estrategias que permitan minimizarlos.

- Sesgos de selección: Podríamos incurrir en dicho sesgo si hubiera diferencias sistemáticas entre las características de los sujetos seleccionados para el estudio y los que no se seleccionaron²⁰. Por ejemplo, en nuestro caso, podríamos estar seleccionando a una población que acudiera con más frecuencia a Atención Primaria para seleccionar los controles.
- Sesgos de medición²⁰:
 - **Sesgo de recuerdo o de memoria**: Podría suceder que las participantes no recordaran haber sufrido alguna ITU si éstas fueron poco sintomáticas. También podrían no recordar medicación que tomen ocasionalmente (antiinflamatorios, antiácidos...).
 - **Sesgo de procedimiento**: En nuestro caso el procedimiento consiste en analizar muestras y hay que tener en cuenta que, pese a haber sido congeladas para preservar al máximo sus propiedades, se han podido ver mínimamente alteradas y con ello sus resultados.
 - **Sesgo de atención o efecto Hawthorne**: Ocurre cuando los participantes en el estudio alteran su comportamiento al saber que están siendo observados. De esta manera, tanto sujetos como controles podrían cambiar su dieta por una más sana o alterar la toma de fármacos, factores que podrían de algún modo modificar la composición de la muestra que se pretende analizar.

- Sesgos de confusión: Se podrían ver asociados los resultados del estudio a otras variables. Para limitar los sesgos de confusión se pueden estratificar los datos obtenidos según algunas de estas variables. En este estudio se han estratificado según algunos aspectos de las relaciones sexuales, edad y toma previa de fármacos, a la vez que se ha recogido información sobre hábitos alimenticios, IMC, y consumo de tabaco y alcohol.

8. PLAN DE DIFUSIÓN

El investigador se compromete a publicar los datos sean cuales sean los resultados. Así mismo, se propondrá la realización de ponencias en congresos científicos sobre el estudio de la microbiota y en congresos de urología en que se traten las infecciones urinarias, así como realizar sesiones formativas sobre el tema a los profesionales implicados y la publicación en revistas especializadas en urología, gastroenterología y microbiología.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Valdevenito JP, Álvarez D. Infección urinaria recurrente en la mujer. Rev Med Clin Condes. 2018 Feb, 29 (2): 222-231.
2. Spaulding CN., Klein RD., Ruer S, Kau AL., SchreiberHL., CusumanoZ. Selective depletion of uropathogenic E. coli from the gut by a FimH antagonist. Nature. 2017. 546 (7659): 528-532.
3. Barber AE, Norton JP, Spivak AM, y Mulvey MA. Urinary tract infections: Current and emerging management strategies. Clin Infect Dis. 2013 May. 57(5): 719-724.
4. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. Nat Rev Urol. 2010 Dec. 7(12):653-660.
5. Hooton TM. Uncomplicated Urinary Tract Infection. N Engl J Med. 2012. 366(11): 1028-1037.
6. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, y Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 May. 13(5): 269-284.

7. 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.* 2019. 10(5521).
8. Paalanne N, Huso A, Salo J, Pieviläinen O, Tejesvi MV, Koivusaari P. Intestinal microbiome as a risk factor for urinary tract infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018. 37: 1881-1891
9. Alcorcon T, D'Auria G, Delgado S, del Campo R, Ferrer M. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Procedimientos en Microbiología. Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)* 2016. 59: 13-18.
10. Martin R, Soberon N, Vazquez F, Suarez JE. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2008 Mar. 26(3): 160-167.
11. Beltrán de Heredia MR. Microbiota autóctona. *Farm Prof.* 2017 Mar. 31(2):17-21
12. Pigrau-Serralach C. Infecciones urinarias recurrentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005. 23: 28-39.
13. Pigrau C. Infecciones del tracto urinario nosocomiales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013 Nov. 31(9): 614-624
14. Maleón-Getino A, Rodríguez-Casado CI, Méndez-Vierra J. Sample size in metagenomics, a bayesian approach using BDSbiost3 for R. *GRBIO, University of Barcelona. XVI Conferencia Española de Biometría-CEB* 2017.
15. Monleón-Getino T, Guilanya GAIA, un programari d'anàlisi metagenòmica. 2018.

16. Durk P, Castillo E, Márquez-Magaña L, Grosicki GJ, Bolter ND, Lee CM, et al. Gut microbiota composition is related to cardiorespiratory fitness in healthy young adults. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2019 May. 29(3): 249-253
17. Somarriba, E. Diversidad de Shannon. *Agrofor Am.* 1999. 6 (23):72-74.
18. Moreno, C. E. Métodos para medir la biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA. 2001. vol.1. Zaragoza: 84 pp.
19. Tariq R, Pardi DS, Tosh PK, Walker RC, Reasonable RR, Khanna S. Fecal Microbiota Transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection reduces recurrent urinary tract infection frequency. *Clin Infect Dis.* 2017 Nov. 65(10): 1745-1747
20. Manterola C, Otzen T. Los sesgos en investigación clínica. *Int. J. Morphol.*, 33(3) (2015): 1156-1164
21. Anton Jimenez, Manuel, Raquel Esteban Saiz, y Raquel Ortes Gomez. «Infección urinaria.» *Tratado de geriatría para residentes. Sociedad Española de Geriatría y Gerontología (SEGG)*, 2006: 429-433.
22. Guía para la correcta elaboración de un modelo de hoja de información al paciente y consentimiento informado (HIP/CI)” del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Anexo VIIIA, actualizado en Febrero de 2018

ANEXO

Figura 1. Factores de riesgo relacionados con la recurrencia de las infecciones urinarias.

Esquema extraído y modificado de Pigrau-Serralach 2005¹².

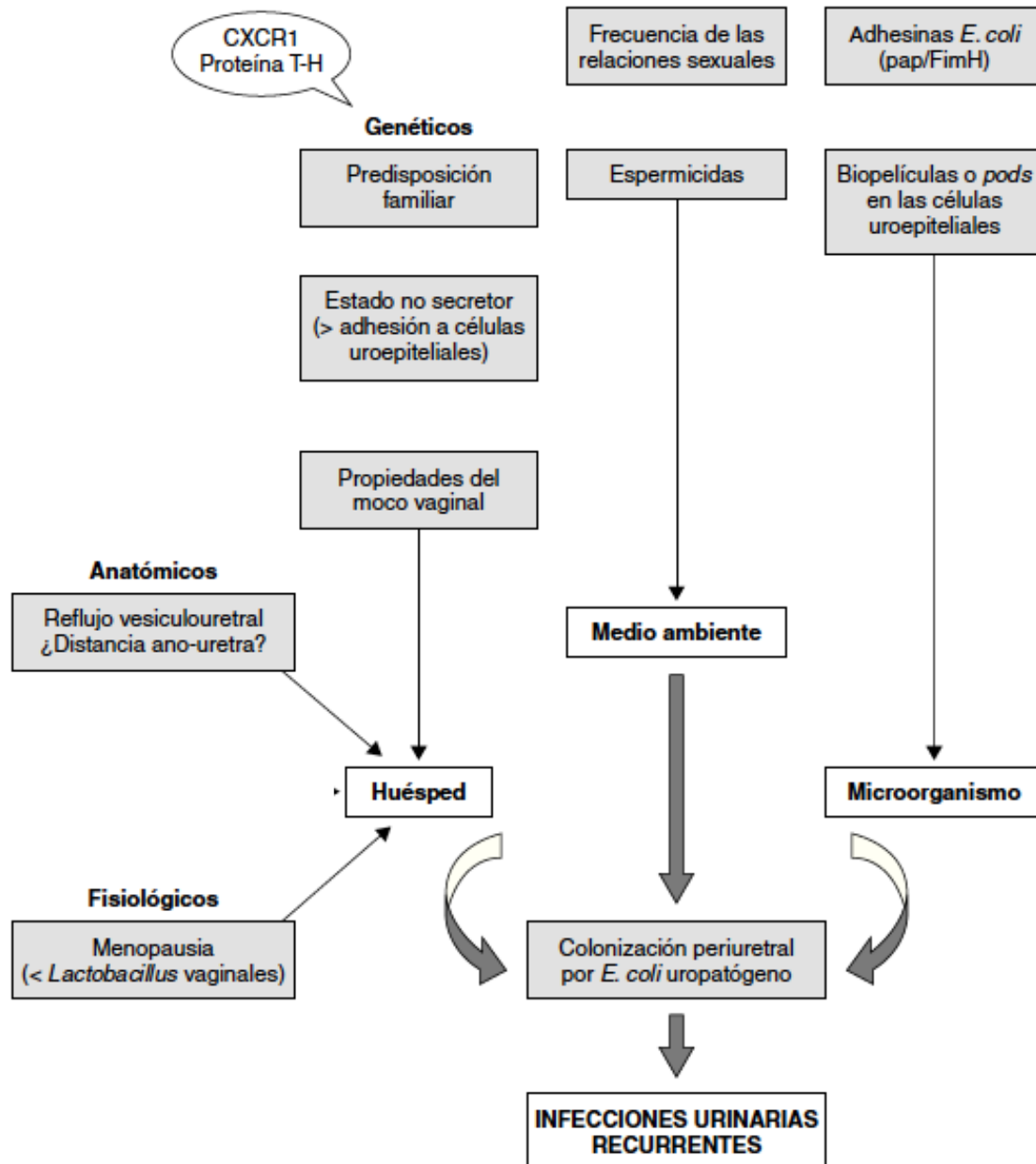


Figura 2. Diagrama de prevalencia de los distintos patógenos causantes de ITU.
 Figura extraída de Flores-Mireles et al., 2015⁶.

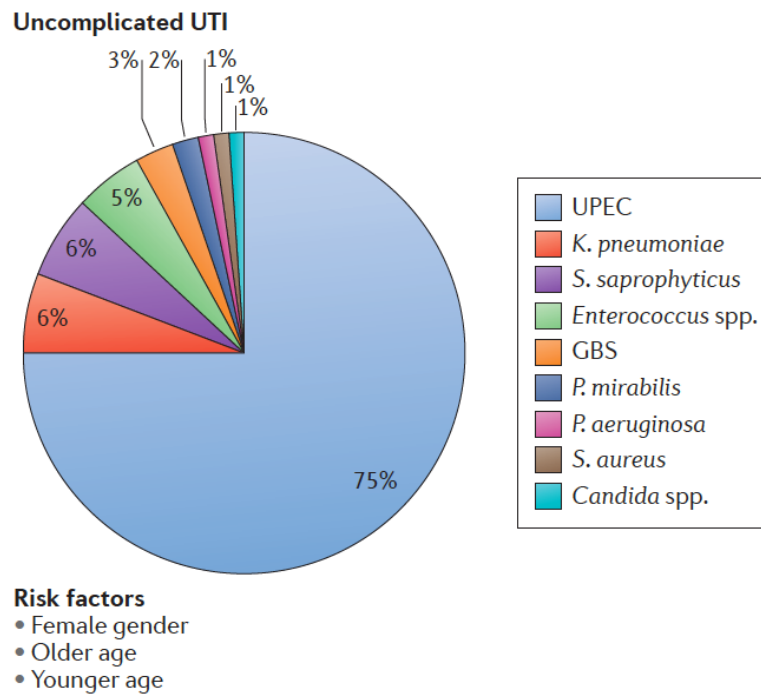


Tabla 1. Microorganismos que componen la microbiota vaginal de mujeres sanas.
 Tabla extraída de Martin et al, 2008¹⁰.

TABLA 1. Géneros de microorganismos que se encuentran en la vagina de mujeres sanas

| | |
|---|---|
| Cocos y bacilos grampositivos anaerobios aerotolerantes | <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> |
| Cocos y bacilos grampositivos anaerobios facultativos | <i>Corynebacterium</i> <i>Gardnerella</i> <i>Staphylococcus</i> (fundamentalmente <i>S. epidermidis</i>) |
| Bacilos gramnegativos anaerobios facultativos | <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> |
| Micoplasmas | <i>Mycoplasma</i> (sobre todo <i>M. hominis</i>) <i>Ureaplasma</i> |
| Bacilos y cocos grampositivos anaerobios estrictos | <i>Atopobium</i> <i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Eubacterium</i> |
| Bacilos gramnegativos anaerobios estrictos | <i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> |

Tabla 2. Causas urológicas de recaída o persistencia de bacteriuria en la mujer.
 Extraída de Valdevenito, 2018¹.

TABLA 1. Causas urológicas de recaída o persistencia bacteriana en la mujer

| |
|--|
| Litiasis infecciosas |
| Riñón atrófico unilateral infectado |
| Duplicación ureteral y uréter ectópico |
| Cuerpos extraños |
| Divertículo uretral y glándulas periuretrales infectadas |
| Riñón esponjoso medular unilateral |
| Muñón ureteral infectado después de nefrectomía |
| Quiste del uraco infectado |
| Quistes de los cálices renales comunicantes infectados |
| Necrosis papilar |
| Absceso perivesical fistulizado a vejiga |

Figura 3. Diagrama del procedimiento de estudio

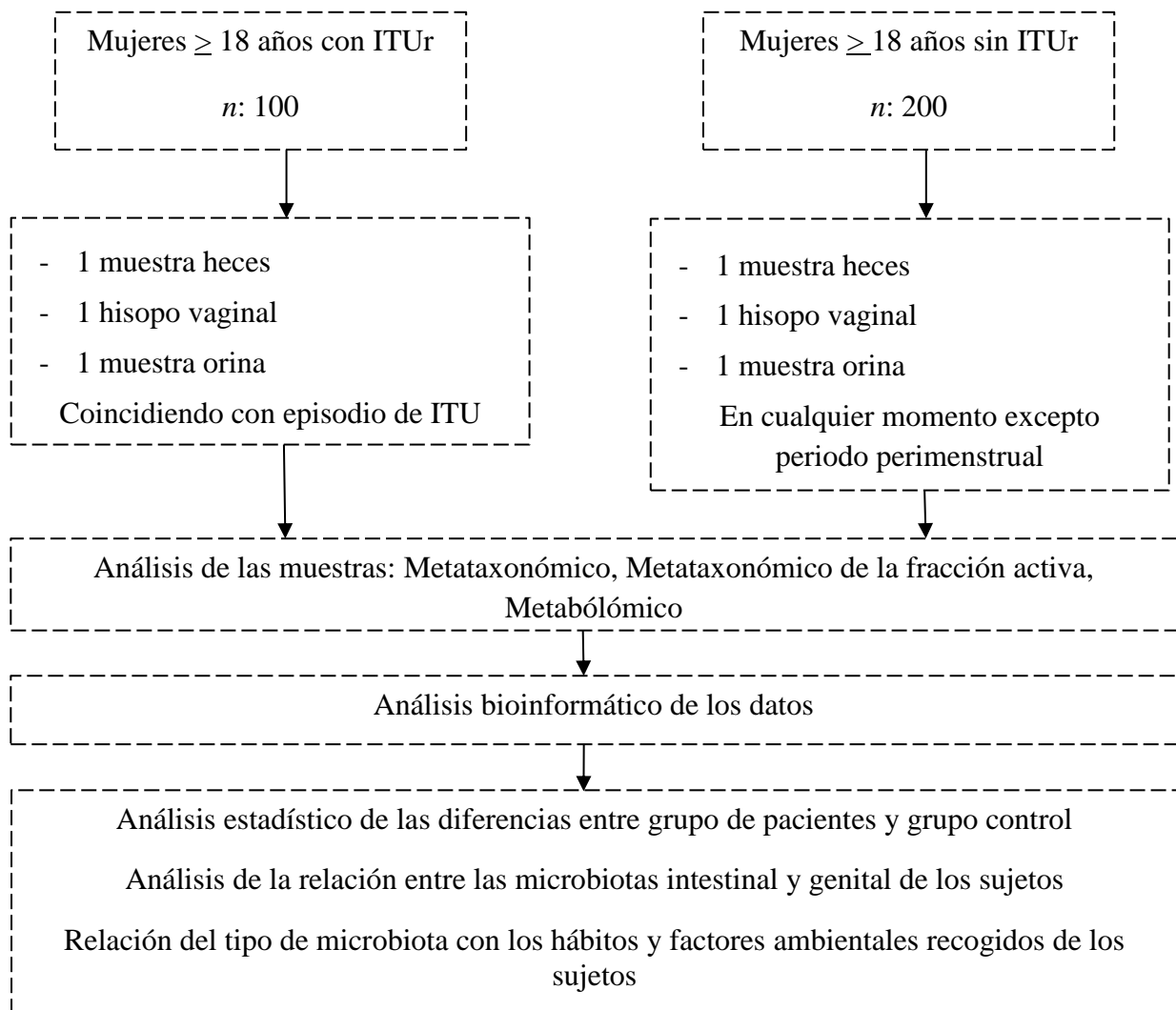


Tabla 3. Cuestionario sobre hábitos de vida

| | | |
|--|-------------------------|---|
| Indique aquí su peso (Kg): | | |
| Indique aquí su altura (cm): | | |
| Marque con una x en las casillas correspondientes | | x |
| Edad | 18-25 años | |
| | 26-35 | |
| | 36-50 | |
| | >50 | |
| Relaciones sexuales/semana | 0 | |
| | <3 | |
| | 3-7 | |
| | >7 | |
| Parejas sexuales en el último año | 0 | |
| | 1 | |
| | 2-5 | |
| | >5 | |
| ¿Usa espermicidas en las relaciones sexuales? | Sí | |
| | No | |
| ¿Es Ud. usuaria de un dispositivo intrauterino? | Sí | |
| | No | |
| ¿Toma anticonceptivos orales? | Sí | |
| | No | |
| ¿Ha tomado antibióticos en el último mes? | Sí | |
| | No | |
| ¿Ha tomado antiinflamatorios en el último mes? | Sí | |
| | No | |
| ¿Ha tomado antiácidos en el último mes? | Sí | |
| | No | |
| ¿Es Ud. Fumadora? | Sí, <1 paquete/semana | |
| | Sí, 1-7 paquetes/semana | |
| | Sí, ≥7 paquetes/semana | |
| | No | |
| Consumo de alcohol semanal | 0 | |
| | 1-2 UBE* | |
| | ≥3 UBE* | |
| Regímenes alimentarios especiales | Vegetariana | |
| | Vegana | |
| | Dieta sin gluten | |
| <p>* UBE: Unidad de Bebida Estándar (8-13g alcohol puro). Correspondencias:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 UBE: 1 cerveza, 1 copa de vino o cava - 2 UBE: 1 copa de destilados (wiski, ginebra, vodka) o 1 combinado | | |

Tabla 4. Subgrupos de estudio

| | | |
|--|-------|----------|
| Edad (años) | 18-25 | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | 25-35 | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | 35-50 | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | >50* | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| Relaciones sexuales** (Promedio por semana) | 0 | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | <3 | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | >3 | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| Uso de espermicidas | Sí | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | No | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| Uso de DIU | Sí | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | No | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| Toma de antiinflamatorios | Sí | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | No | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| Toma de antiácidos | Sí | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | No | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| Toma de ACO | Sí | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| | No | Con ITUr |
| | | Sin ITUr |
| <p>* En pacientes menopáusicas se produce una atrofia de la mucosa vaginal que se manifiesta clínicamente como sequedad vaginal, prurito, irritación y dispareunia. Además, como consecuencia del déficit estrogénico puede aumentar el pH vaginal y reducirse la concentración de <i>Lactobacilos</i> por lo que son más susceptibles a la colonización por <i>E. coli</i> y otras enterobacterias^{11,21}.</p> | | |
| <p>** En un estudio multivariado se determinó que en mujeres con relaciones diarias el riesgo de ITUr era 9 veces superior, así como en las que habían cambiado recientemente de pareja sexual^{4,12}.</p> | | |

Tabla 5. Cronograma del estudio

| AÑO 2020 | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic | |
| | | | | | | | | | | | | Búsqueda y revisión de material bibliográfico |
| | | | | | | | | | | | | Construcción del equipo de investigadores |
| | | | | | | | | | | | | Redacción del protocolo de estudio |
| | | | | | | | | | | | | Preparación de los materiales necesarios |
| | | | | | | | | | | | | Reuniones y discusiones entre investigadores |
| | | | | | | | | | | | | Presentación del proyecto al CEIC |
| | | | | | | | | | | | | Tiempo estimado de espera de aprobación |
| AÑO 2021 | | | | | | | | | | | | |
| Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic | |
| | | | | | | | | | | | | Inicio del reclutamiento de participantes al estudio: <ul style="list-style-type: none"> - Explicación y firma de CI - Realización encuestas de hábitos de vida - Obtención de muestras - Realización ecografías renovesicales |
| | | | | | | | | | | | | Puesta a punto de las técnicas genómicas |
| | | | | | | | | | | | | Extracción y análisis de DNA y RNA 16s |
| | | | | | | | | | | | | Procesamiento metabolitos por espectrometría de masas |
| | | | | | | | | | | | | Procesamiento por secuenciación masiva |
| AÑO 2022 | | | | | | | | | | | | |
| Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic | |
| | | | | | | | | | | | | Procesamiento por secuenciación masiva |
| | | | | | | | | | | | | Análisis bioinformático |
| | | | | | | | | | | | | Análisis estadístico |
| | | | | | | | | | | | | Puesta en común y discusión |
| | | | | | | | | | | | | Redacción de la tesis |
| | | | | | | | | | | | | Publicación |

Escrito 1. Hoja de información a la paciente²¹

Título del estudio: “Relación entre la microbiota intestinal y vaginal con las infecciones recurrentes en mujeres”

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos y por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios de acuerdo con la legislación vigente, el Real Decreto 1090/2015 de 4 de diciembre y el Reglamento Europeo 536/2014 de 16 de abril, por los que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.

Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda decidir si acepta o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

La participación en este estudio es voluntaria y tiene derecho a retirar su consentimiento en el momento que lo desee y abandonar el estudio, sin dar explicaciones y sin que ello repercuta a su atención médica.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El presente estudio corre a cargo del Departamento de Microbiología del Hospital de Sant Pau y Fundación Puigvert de Barcelona, con la participación de los centros de Atención Primaria del Área de Barcelona.

Se trata de un estudio observacional en el que se pretende establecer diferencias entre la composición de la microbiota, también llamada flora, intestinal y vaginal en mujeres mayores de 18 años con y sin infecciones urinarias de repetición. Para ello se prevé necesaria la participación de 100 pacientes con infecciones urinarias recurrentes y 200 sin ellas.

¿En qué consiste su participación?

Durante el estudio se recogerán 3 muestras que aportará la participante con el material que le será proporcionado: una muestra de heces, una de exudado vaginal mediante hisopo y una muestra de orina. Estas muestras podrán ser recogidas en cualquier momento por la participante si se encuentra en el grupo control (sin ITUr). Si se trata de una paciente del grupo de estudio (con ITUr) se intentará recoger las tres muestras durante el periodo de infección y siempre antes de la toma de cualquier antibiótico. Las muestras tendrán que ser congeladas inmediatamente por la participante y llevadas al Laboratorio o Centro de recogida pertinente en menos de 72h desde su recogida.

Se pedirá también a las pacientes que cumplimenten un cuestionario sobre algunos hábitos y la realización de ecografías renovesicales a las pacientes con ITUr que no tengan el estudio hecho previamente.

CONFIDENCIALIDAD

El promotor se compromete al cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal y al Real Decreto que la desarrolla (RD 1720/2007). Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones en caso de urgencia médica o requerimiento legal. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustarán a lo dispuesto en esta ley.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

El estudio será financiado con financiación pública y no tiene ningún objetivo comercial.

Los resultados que se obtengan podrán beneficiar el estudio de nuevos tratamientos para erradicar las infecciones urinarias recurrentes en mujeres.

Escrito 2. Consentimiento informado²¹

ESTUDIO: “Relación entre la microbiota intestinal y vaginal con las infecciones recurrentes en mujeres”

Yo (nombre y apellidos) _____ , con DNI _____, mayor de edad, declaro que he leído la *Hoja de información del estudio* que se me ha entregado, he recibido y comprendido suficiente información y he podido formular las preguntas que he creído oportunas, habiendo recibido respuestas a las mismas que he comprendido.

He sido informada por el/la Dr/Dra _____, con N° colegiado _____

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que puedo retirarme del estudio en cualquier momento que lo desee, sin dar explicaciones y sin que ello repercuta en mi atención médica.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma de la participante

Fecha

Firma del/la Dr/Dra

Fecha

Este documento se firmará por duplicado, quedándose una copia el investigador y otra la participante.