



**Universidad Nacional Autónoma de México**

Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Maestría en Investigación Clínica Experimental de la Salud

**Facultad de Química**

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Estandarización y elaboración de microbiota fecal liofilizada para trasplante en pacientes colonizados por bacterias multirresistentes y/o *Clostridiodes difficile*: Estudio piloto para evaluación de descolonización y cambios en la microbiota intestinal**

**T E S I S**

Que para obtener el grado en

**Maestra en Ciencias**

**Presenta:** EBC. Silvana Estefanía Torres Veintimilla

**Directora de Tesis:** Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Comité Tutor:**

Dra. Nimbe Torres y Torres

Instituto Nacional de ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dra. Rosa María Wong Chew  
Facultad de Medicina UNAM

Ciudad Universitaria, Cd de México, Noviembre 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice

CAPITULO I .....	9
1.1 INTRODUCCIÓN .....	10
1.2 ANTECEDENTES .....	13
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
1.4 JUSTIFICACIÓN .....	17
1.5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	18
1.6 HIPÓTESIS .....	18
CAPITULO II .....	19
2. MARCO TEÓRICO .....	19
2.1 <i>Clostridiodes difficile</i> .....	19
2.2 Epidemiología de <i>Clostridiodes difficile</i> .....	19
2.3 Factores de virulencia de <i>Clostridiodes difficile</i> .....	20
2.4 Infección por <i>Clostridiodes difficile</i> (CDI).....	23
2.5 Factores de Riesgo asociados a la infección por <i>Clostridiodes difficile</i> .....	24
2.6 Patogenia de la diarrea asociada a <i>Clostridiodes difficile</i> .....	24
2.7 Manifestaciones clínicas de la infección por <i>Clostridiodes difficile</i> (CDI):.....	26
2.8 Diagnóstico de la enfermedad por <i>Clostridiodes difficile</i> .....	26
2.9 Tratamiento para la Infección por <i>Clostridiodes difficile</i> .....	27
2.10 Cepa NAP1 B1 027 .....	27
2.11 Colonización por <i>Clostridiodes difficile</i> .....	28
2.12 Epidemiología de la colonización por <i>Clostridiodes difficile</i> .....	28
2.13 Principales Reservorios de <i>Clostridiodes difficile</i> .....	29
2.14 Mecanismos de Colonización de <i>Clostridiodes difficile</i> .....	30
2.15 Pruebas de laboratorio para detectar colonización .....	30
2.16 Microbiota intestinal .....	31
2.17 Disbiosis Intestinal .....	33
2.18 Microorganismos resistentes a los antimicrobianos .....	34
2.19 Trasplante de Microbiota Fecal.....	34
CAPITULO III .....	36
3. OBJETIVOS .....	36
3.1 Objetivo General .....	36
3.2 Objetivos Secundarios .....	36

CAPITULO IV .....	37
MÉTODO.....	37
4.1 Tipo de estudio.....	37
4.2 Población de estudio.....	37
4.3 Tamaño de muestra .....	37
Criterios de Selección del Donador Universal .....	38
Criterios de Selección de pacientes para el trasplante de materia fecal.....	39
Definiciones.....	39
4.7 METODOLOGÍA .....	40
4.7.1 Estandarización del tratamiento de heces:.....	40
4.7.2 Estandarización de la Liofilización de heces: .....	40
4.7.3 Análisis de Viabilidad de Membrana y cuantificación de bacterias: .....	41
4.7.4 Estandarización de las cápsulas:.....	42
4.7.5 Encapsulado de las heces liofilizadas .....	42
4.7 Proceso de muestras de materia fecal del Donador universal .....	43
4.8 Proceso en pacientes que se reclutaron para recibir el TMF .....	44
4.9 Análisis de microbiota intestinal con la secuenciación del gen 16S rRNA .....	44
ANÁLISIS: .....	45
ASPECTOS ÉTICOS: .....	46
CAPITULO V .....	47
7. RESULTADOS.....	47
7.1 Estandarización del proceso de liofilización de las heces .....	47
7.2 Determinación de viabilidad de membrana.....	47
7.3 Estandarización de las cápsulas.....	47
7.4 Encapsulado de las heces liofilizadas .....	47
7.5 Almacenamiento de las cápsulas con microbiota fecal liofilizada .....	47
7.6 Selección del donador universal .....	47
7.7 Población de pacientes seleccionados para trasplante de microbiota fecal .....	48
7.8 Análisis de los cambios en descolonización posterior a la administración del trasplante en los grupos de estudio.....	48
7.9 Análisis de cambios en el perfil de la microbiota: basal y post TMF .....	51
CAPITULO VI .....	65
8. DISCUSIÓN .....	65
9. LIMITACIONES.....	70
10. CONCLUSIONES .....	70



11. BIBLIOGRAFÍA .....	71
12. ANEXOS .....	75
12.1 ANEXO 1 Cuestionario para Donador Universal .....	75
12.2 ANEXO 2 Consentimiento Informado Donador .....	78
12.3 ANEXO 3 Consentimiento informado paciente .....	87

## Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1. Estudios en los que se utilizó el Trasplante de Microbiota fecal para la resolución de diarrea por <i>Clostridiodes difficile</i> . .....	14
Tabla 2. Estudios en los que se utilizó el Trasplante de Microbiota fecal para disminuir la colonización intestinal por microorganismos multirresistentes. ....	15
Tabla 3. Resultados del tamizaje en heces y sangre realizado al donador universal previo obtención de microbiota fecal .....	48
Tabla 4. Resultados obtenidos de la prueba GDH de <i>C. difficile</i> , basal y post-trasplante en los grupos de pacientes del estudio.....	49
Tabla 5. Resultados de las toxinas de <i>C. difficile</i> por medio del panel Film Array antes y después del trasplante en los grupos de pacientes que recibieron TFM o placebo. ....	50
Tabla 6. Resultados de la evaluación de descolonización de bacterias multirresistentes mediante cultivo en los grupos de pacientes del estudio.....	51
Tabla 7. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Phylum en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.....	55
Tabla 8. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Clase en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.....	56
Tabla 9. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Orden en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.....	60
Tabla 10. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Familia en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.....	60
Tabla 11. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Género en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.....	61
Tabla 12. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Especie en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.....	63
Figura 1. Esquema de PaLoc (locus de patogenicidad) de <i>Clostridiodes difficile</i> .....	21
Figura 2. Ciclo de Infección por <i>Clostridiodes difficile</i> .....	25
Figura 3. Patogénesis de <i>Clostridiodes difficile</i> .....	26
Figura 4. Colonización por <i>Clostridiodes difficile</i> .....	31
Figura 5. Diagrama de flujo para selección y aleatorización de pacientes para el estudio piloto .....	37
Figura 6. Proceso de obtención de heces liofilizadas.....	41

Figura 7. Análisis de viabilidad de la microbiota liofilizada .....	41
Figura 8. Encapsulado de microbiota fecal.....	43
Figura 9. Índice de Shannon para alpha diversidad en el donador universal y grupos de estudio Basal y Post .....	52
Figura 10. Análisis de Coordenadas Principales para Beta diversidad (PcoA) basada en distancias Unifrac.....	54
Figura 11. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Phylum en el donador universal y los grupos de estudio.....	56
Figura 12. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Clase del donador universal y los grupos de estudio.....	57
Figura 13. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Orden del donador universal y los grupos de estudio.....	59
Figura 14. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Familia en el donador universal y los grupos de estudio.....	60
Figura 15. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Género para donador universal y grupos de estudio.....	62
Figura 16. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Especie para donador universal y grupos de estudio.....	64

## RESUMEN

**Antecedentes:** Existe una relación entre el uso de antibióticos, las alteraciones de la microbiota intestinal y las infecciones por microorganismos que colonizan el intestino como *Clostridiodes difficile* y bacterias multirresistentes. El objetivo de este estudio fue estandarizar el proceso de elaboración de cápsulas de microbiota intestinal liofilizada para trasplante en pacientes colonizados por bacterias multirresistentes y/o *C. difficile* y evaluar los cambios en la descolonización y microbiota intestinal.

**Métodos:** Estudio piloto clínico controlado aleatorizado cegado en pacientes que recibieron tratamiento antimicrobiano. La estandarización incluyó: tratamiento de heces, liofilización, cuantificación y viabilidad bacteriana mediante citometría de flujo, encapsulado y almacenamiento. Se seleccionó un donador universal por medio de entrevista, cuestionario, tamizaje en sangre y heces incluida la búsqueda de bacterias multirresistentes. El análisis de microbiota intestinal se realizó por secuenciación de las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA de heces del donador y de los pacientes en condiciones basales y post trasplante en la plataforma Illumina Miseq. Los datos obtenidos de la secuenciación se analizaron usando QIIME v1.9 y las lecturas filtradas se asignaron a los niveles de phylum, clase, orden, familia, género y especie. Para el análisis de los datos obtenidos sobre descolonización se utilizó Q de Cochrane y chi cuadrada en el programa SPSSv15.

**Resultados:** Se evaluaron 85 candidatos para donador universal de los cuales solamente uno participó en el estudio. Las condiciones de liofilización estandarizadas fueron 72 horas a  $-52^{\circ}\text{C}$  con una presión de 0,2 mbar, se utilizaron cápsulas entéricas con  $7 \times 10^{11}$  bacterias viables por cápsula y fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En la evaluación de descolonización para *C. difficile*, 3 de 6 pacientes (50%) presentaron prueba negativa de glutamato deshidrogenasa después de recibir 4 cápsulas de microbiota y 1/6 (16.7%) pacientes una prueba negativa después de la administración de placebo, la evaluación de las toxinas tuvo resultados similares. *Escherichia coli* productora de betalactamasa fue la bacteria más frecuente en 20/22(68.2%) de los pacientes, de los cuales 8/11 (73%) se descolonizaron posterior al trasplante. Se observó que la microbiota del donador tuvo una mayor diversidad comparada a la de los pacientes en condición basal, posterior al trasplante esta aumentó a un porcentaje similar a la del donador sobre todo con las especies bacterianas benéficas: *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides eggerthii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia faecis* y *Akkermancia muciniphila*, así como la disminución de *Bacteroides uniformis*, *Parabacteroides distasonis*, *Veillonella dispar* y *Escherichia coli*.

**Conclusiones:** La elaboración de microbiota fecal liofilizada para su administración en cápsulas es una alternativa efectiva y segura para el trasplante de microbiota ya que puede erradicar bacterias multirresistentes que se encuentran colonizando el intestino, genera cambios en la microbiota intestinal, aumenta su diversidad y establece en su receptor un perfil similar a la del donador. No se observó diferencia en la administración de 4 u 8 cápsulas con microbiota fecal liofilizada.

**Palabras clave:** liofilización, trasplante de microbiota intestinal, *Clostridiodes difficile*, bacterias multirresistentes.

## ABSTRACT

**Background:** There is a relationship between the antibiotics impact on the intestinal microbiota and infections by microorganisms that colonize the intestine such as *Clostridiodes difficile* and multi-resistant bacteria. The objectives of the study were standardizing the process for preparing freeze dried fecal microbiota capsules for transplantation in patients colonized by multidrug-resistant bacteria and *C. difficile* and to evaluate changes in decolonization and intestinal microbiota.

**Methods:** A pilot randomized controlled blinded clinical trial with patients who received an antibiotic regimen. The standardization of stool processing included: stool treatment, freeze drying, quantification and bacterial viability by flow cytometry, encapsulation and storage. A universal donor was selected by interview, survey, blood and stool screening, including search for multidrug-resistant bacteria. Intestinal microbiota analysis was carried out by V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene sequencing from donor and patients stool under baseline and post-transplant conditions on Illumina Miseq platform. The raw sequencing data were analyzed using QIIME v1.9 and filtered reads were assigned to phylum, class, order, family, genus and species levels. For the analysis of obtained decolonization data, Cochran's Q and chi square were used in the SPSSv15 program.

**Results:** 85 universal donor candidates were evaluated, of which only one participated in the study. Standardized freeze drying conditions were 72 hours at - 52 ° C with a pressure of 0.2 mbar, enteric capsules with  $7 \times 10^{11}$  viable bacteria per capsule were used and they were stored at -80 ° C. Decolonization evaluation for *C. difficile*, 3/6 patients (50%) patients showed negative test for glutamate dehydrogenase after receiving 4 microbiota capsules and 1/6 (16.7%) patients a negative test after administration of placebo, the evaluation of toxins had similar results.

Beta-lactamase-producing *Escherichia coli* was the most frequent bacterium in 20/22 (68.2%) patients, of which 8/11 (73%) were decolonized after transplantation. We observed that donor's microbiota had a greater diversity compared to patients in baseline condition, after transplantation it increased to a similar percentage to that of donor, especially with the beneficial bacterial species: *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides eggerthii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia faecis* and *Akkermancia muciniphila*, and the decrease of *Bacteroides uniformis*, *Parabacteroides distasonis*, *Veillonella dispar* and *Escherichia coli*.

**Conclusions:** Freeze dried fecal microbiota preparation for administration in capsules is an effective and safe alternative for fecal microbiota transplantation since it can eradicate multi-resistant bacteria that are colonizing the intestine, it also generates changes at the level of intestinal microbiota, increases its diversity and establishes in its recipient a similar profile to that of the donor. No difference was observed in 4 or 8 capsules administration with lyophilized fecal microbiota.

**Key words:** lyophilization, intestinal microbiota transplantation, *Clostridiodes difficile*, multi-resistant bacteria.

## ABREVIATURAS

ALT Alanina aminotransferasa

ARN Ácido ribonucleico

AST Aspartato aminotransferasa

BCT Trasplante de un consorcio bacteriano

BLEE Betalactamasa de espectro extendido

CCNA Ensayo de Neutralización de Citotoxicidad Celular

CD *Clostridioides difficile*

CDC Centros de Control y Prevención de las Enfermedades

CDI Infección por *Clostridioides difficile*

DACD Diarrea asociada a *Clostridioides difficile*

EBLEE Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido

EEUU Estados Unidos de América

ERC Enterobacterias resistentes a carbapenémicos

ERV Enterococo resistente a vancomicina

ESCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

GDH Glutamato Deshidrogenasa

HDL High density lipoprotein (Lipoproteína de alta densidad)

IDSA Infectious Diseases Society of America

IRCD Infección recurrente por *Clostridioides difficile*

IMC Índice de Masa Corporal

kDa Kilodaltones

LDL Low density lipoprotein (Lipoproteína de baja densidad)

MDR Bacterias multirresistentes

NAAT Amplificación de ácidos nucleicos

OMS Organización Mundial de la Salud

OTUs Operational Taxonomic Unit

QIIME Quantitative Insights Into Microbial Ecology

PCR Reacción de la polimerasa en cadena

SCFAs Short Fatty Acids (Ácidos grasos de cadena corta)

TMF Trasplante de Microbiota Fecal

UFC Unidades Formadoras de Colonias

VDRL Venereal Disease Research Laboratory

VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VLDL Very Low density lipoprotein (Lipoproteína de muy baja densidad)

## **CAPITULO I**

## 1.1 INTRODUCCIÓN

Las infecciones por bacterias multirresistentes (MDR) y diarrea asociada a *Clostridiodes difficile* (DACD) son problemas graves de salud pública, por lo que ya han sido clasificadas por los Centros de Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) como amenazas urgentes de atender. Existen diversos factores asociados a estas infecciones, como la colonización en el ambiente hospitalario por bacterias con susceptibilidad disminuida a diversos antimicrobianos y el uso de dispositivos biomédicos invasivos. Sin embargo, se ha descrito el uso de antibióticos como el principal factor de riesgo, ya que éstos no solo actúan sobre el agente infeccioso sino que además pueden ocasionar un desequilibrio en la microbiota intestinal también conocido como disbiosis intestinal y propician la resistencia bacteriana. <sup>(1)(36)(37)(38)</sup>

El desarrollo de este tipo de infecciones puede ocurrir durante la estancia hospitalaria o hasta varias semanas después del egreso del paciente, por ello se les conoce como “infecciones asociadas a cuidados de la salud”. Los agentes etiológicos que se asocian con mayor frecuencia a estas infecciones son: enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (EBLEE), enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC), enterococo resistente a vancomicina (ERV) y *C.difficile*. <sup>(40)</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha descrito que la colonización intestinal por ciertas bacterias patógenas puede desencadenar infecciones en el futuro, afectando entre el 5 y el 15% de los pacientes hospitalizados y hasta 40% de los pacientes del área de atención crítica. Estas infecciones pueden ocasionar brotes hospitalarios a los cuales se les atribuye una importante morbimortalidad ya que están asociadas a un mayor riesgo de choque séptico, lesión renal aguda y estancia hospitalaria prolongada. En 2015, nuestro grupo de trabajo (Torres González y cols.) determinó en 10.9% la prevalencia de colonización asintomática por ERC con una incidencia de 2.5 casos por 1000 pacientes/año. <sup>(36)(40)</sup>

Por otro lado, en los últimos años los casos de diarrea asociada a *C. difficile* han incrementado en México y el mundo, fenómeno que también se atribuye a la adquisición hospitalaria de algunas cepas virulentas que proliferan en el colon posterior al tratamiento con antimicrobianos (ampicilina, penicilinas, cefalosporinas y

clindamicina principalmente) y finalmente producen toxinas que ocasionan cuadros de severidad variable y en ocasiones requieren colectomía para su tratamiento. <sup>(14)</sup>

Actualmente, el tamizaje de estas bacterias resistentes se realiza mediante el hisopado rectal o cultivo de heces utilizando medios de cultivo selectivos, el en caso de *C. difficile* mediante la detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) que define su presencia en el colon o a través de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para la búsqueda de sus toxinas. <sup>(15)</sup>

A pesar de que se han establecido estrategias dirigidas a disminuir estas infecciones (lavado frecuente de manos, aislamiento de posibles casos) su éxito es limitado, es por ello importante establecer protocolos para la detección de la colonización por estos microorganismos y tratamientos innovadores enfocados a disminuirlos o eliminarlos sin la necesidad de usar más antibióticos.

En la actualidad, el trasplante de microbiota fecal (TMF) es considerado como una alternativa efectiva para tratar las infecciones antes mencionadas, tratamiento en el cual se utilizan las heces de un donador sano para administrarlas en un receptor y de esta manera proveer bacterias comensales que puedan reemplazar a las patógenas. Los primeros reportes de su utilización fueron en el siglo IV en China y a partir de 1958 se empezó a utilizar en casos de diarrea por *C. difficile* y colitis pseudomembranosa. En los últimos años se ha reportado una tasa de resolución de hasta el 95% y por ello se ha generado un interés particular en el estudio de la microbiota intestinal. <sup>(41)</sup>

La microbiota intestinal es definida como el conjunto de microorganismos (bacterias, virus, hongos) que habitan en el intestino y cumplen diversas funciones digestivas, inmunológicas, metabólicas y de protección. Para fines de este estudio es importante mencionar la resistencia a la colonización; la cual es considerada como la capacidad de la microbiota para impedir la colonización de patógenos a través de mecanismos como competencia de nutrientes, cambios de pH, ocupación de nichos y generación de metabolitos. Existen diversos factores como la dieta, raza, estilo de vida, tipo de parto que pueden alterar la composición de la misma, sin embargo, el uso de antibióticos ha sido descrito como uno de los principales riesgos que favorecen para la disbiosis (disminución de la diversidad bacteriana). <sup>(26)(27)(36) (41)</sup>



El estudio de la metagenómica en la última década ha sido de gran importancia, ya que ha permitido conocer el contenido de genes bacterianos y poder así clasificar y analizar el efecto de la microbiota intestinal en la salud y la enfermedad de los seres humanos y se la ha relacionado con predisposición a enfermedades no solo infecciosas sino metabólicas, inflamatorias, neoplásicas e incluso padecimientos mentales. <sup>(39)(41)</sup>

En lo que se refiere a infecciones por *C. difficile* y bacterias resistentes, se ha encontrado una relación directa de la pérdida de la diversidad de la microbiota intestinal (consecuencia de la administración de antibióticos) con la colonización por bacterias resistentes presentes en el entorno hospitalario y el desarrollo posterior de infecciones, así como la eficacia del TMF como tratamiento para las mismas, es por ello que en este estudio piloto se estandarizó la elaboración de cápsulas con microbiota fecal liofilizada de un donador sano para su uso en TMF en pacientes colonizados por bacterias MDR y/o *C. difficile* y su posterior evaluación en la descolonización y composición de la microbiota intestinal. <sup>(12)(41)</sup>

## 1.2. ANTECEDENTES

En 1935, Halle y O'toole describieron a *Bacillus difficile* (*C. difficile* actualmente) como parte de la microbiota fecal en recién nacidos llamándolo así por la complejidad de su aislamiento, posteriormente, en 1978 se determinó como el microorganismo causante de diarrea y desarrollo de colitis pseudomembranosa secundaria a la administración de antibióticos.

La diarrea asociada a *C. difficile* (DACD) tiene distintos grados de gravedad y puede ser mortal, además presenta tasa elevada de recurrencia (20-30%) después del primer episodio y hasta 60% a partir del tercer episodio.

En los últimos años esta infección ha alcanzado mayor relevancia ya que se ha reportado un incremento en el número de casos a nivel hospitalario: 8% en pacientes hospitalizados, 15-25% casos de diarrea asociada a antibióticos, 50-75% por colitis pseudomembranosa y 20-28% en la comunidad. <sup>(6)(7)(8)(11)(14)</sup>

La DACD no es la única infección urgente a atender, según los CDC, la elevada tasa de morbilidad que causan las infecciones por bacterias multirresistentes como EBLEE, ERC y ERV ha afectado más de 2,000,000 de pacientes al año y ha ocasionado 23,000 muertes, lo que ha desencadenado la investigación de posibles factores asociados y la búsqueda de alternativas terapéuticas: <sup>(14)(48)</sup>

Se ha descrito que la colonización de bacterias MDR en el tracto intestinal es un factor de riesgo importante para el desarrollo posterior de infecciones, además de actuar como reservorio y generar diseminación a pesar que el individuo no presente sintomatología clínica. Una de las medidas correctivas que se ha puesto en marcha es la administración de antibióticos, sin embargo, los resultados no han sido los esperados e inclusive se ha visto que su uso favorece la selección de microorganismos resistentes. <sup>(48)</sup>

Por otro lado, la microbiota de personas sanas se ha caracterizado con perfil diverso, sin microorganismos MDR o *C. difficile* por lo que la búsqueda de un individuo sano que cumpla ciertas características como buen estado de salud mental, estilo de vida saludable, parámetros sanguíneos dentro de los valores de referencia así como no presentar infecciones gastrointestinales para la obtención de su microbiota fecal ha

sido objeto de interés en los últimos años y de esta manera el TMF se ha empleado para diferentes padecimientos entre ellos la DACD y la descolonización de patógenos intestinales. <sup>(42) (48) (49)</sup>

### **Trasplante de Microbiota Fecal y diarrea por *Clostridiodes difficile***

En 2011, Hamilton Matthew y cols., administraron TMF por colonoscopia como alternativa terapéutica en 43 pacientes con diarrea recurrente por *C. difficile* utilizando heces de un donador previamente evaluado y observaron resolución clínica en 86% de los pacientes. Además, fue el primer estudio que reportó un procedimiento detallado de la preparación de las heces previa a su administración. <sup>(3)</sup> A partir de este año el número de publicaciones relacionadas al uso de TMF se incrementó y varios autores reportaron eficacia significativa con la utilización de distintos métodos y vías de administración. Tabla 1.

**Tabla 1. Estudios en los que se utilizó Trasplante de Microbiota fecal para la resolución de diarrea por *Clostridiodes difficile*.**

<b>Autor/año</b>	<b>N</b>	<b>Donador</b>	<b>Vía Utilizada</b>	<b>% Resolución</b>
Lee Christine et al./ 2011	232	Donador sano	Enema	84.3%
Van Nood E. et al./2013	43	Donador sano	Sonda nasoduodenal	81%
Youngster Ilan et al./ 2014	20	Donador sano	Colonoscopia	70%
Millan B et al./ 2015	20	Donador sano	Colonoscopia	55%
Hongling Tian et al./2015	1	Donador sano	Oral (cápsulas)	100%
Staley C et al./2016	49	Donador sano	Oral (cápsulas)	88%
Youngster Ilan et al/ 2016	180	Donador sano	Oral (cápsulas)	82%

## Trasplante de Microbiota Fecal para disminuir la colonización intestinal por microorganismos multirresistentes

En el año 2000, Donskey y cols., analizaron la densidad intestinal de enterococo resistente a vancomicina en dos grupos de pacientes, el primero recibió esquema antibiótico dirigido a bacterias anaeróbicas (microbiota intestinal) y el segundo grupo no lo recibió; demostrando aumento significativo de la densidad de EVR en los pacientes que recibieron el esquema de antibióticos comparado con el otro grupo de estudio. <sup>(50)</sup> Con este antecedente y estudios de administración de TMF para DACD, inicia el interés por investigar la relación entre el uso de antibióticos, la pérdida de las especies que forman parte de la microbiota intestinal, proliferación de bacterias patógenas y como es que el TMF puede ser un tratamiento eficaz. Tabla 2.

**Tabla 2. Estudios en los que se utilizó el Trasplante de Microbiota fecal para disminuir la colonización intestinal por microorganismos multirresistentes.**

Autor/año	Microorganismo	N	Donador	Vía Utilizada	Resultado
Jang et al/2015	EVR	11	Hermano	Enema	Sin Descolonización
Crum-Cianflone et al/ 2015	ECR, EVR, MRSA*	11	Hermana	Colonoscopia	Descolonización en 4 pacientes
Jang et al/2015	EVR	11	Hermano	Enema	Sin Descolonización
Dubberke et al/2016	EVR	11	Donador sano	Enema	Descolonización en 8 pacientes
Lagier et al/2015	ECR	1	Sin describir	Sonda nasoduodenal	Descolonización
García-Fernández et al/2016	EBLEE	1	Hijo	Colonoscopia	Descolonización
Davidó et al/2017	ECR y EVR	8	Donador sano	Sonda nasoduodenal	Descolonización en 3 pacientes

\**Staphylococcus aureus* metilicina resistente

Aunque ya existen investigaciones orientadas a tratar DACD o disminuir la colonización de patógenos multirresistentes es necesario explorar alternativas metodológicas en beneficio del paciente.

### 1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antibióticos ejercen un impacto significativo en la microbiota intestinal, ya que pueden ocasionar la disminución de anaerobios, pérdida de resistencia a la colonización, proliferación de microorganismos resistentes y el posterior aumento de la densidad de bacterias MDR colonizantes, lo cual conduce a una elevada tasa de transmisión de infecciones multirresistentes causadas por estas bacterias, algunas como EBLEE, ERV, ERC y *C. difficile* han sido citadas por los CDC como amenazas serias de atender. <sup>(4)</sup>

El TMF, se considera una estrategia efectiva para revertir el daño a la microbiota intestinal y sus respectivas consecuencias, sin embargo, existen ciertas limitaciones que han sido reflejadas en diferentes investigaciones, entre ellas se encuentra la búsqueda y escrutinio de un donador que cumpla con todos los parámetros que permitan un trasplante seguro, métodos invasivos en su administración como la colonoscopia, sonda nasogástrica o la ingesta de cápsulas no entéricas con material líquido, que además de ser un problema estético puede poner en riesgo la salud del paciente, metodología no estandarizada, tiempo, infraestructura y disponibilidad del tratamiento. <sup>(3)(5)(12)</sup>

## 1.4 JUSTIFICACIÓN

La colonización de bacterias multirresistentes no se ha descrito como causa directa de enfermedad, sin embargo, se ha reportado que la pérdida de la resistencia a la colonización, expansión y translocación de estas bacterias patógenas ocasiona mayor probabilidad de desarrollar infecciones, principalmente en tracto urinario y torrente sanguíneo. En los últimos años ha surgido la necesidad de buscar una solución al problema que ocasionan este tipo de infecciones, por ello el TMF ha tomado importancia y aunque la mayoría de estudios señalan su utilización como tratamiento para la infección por *C. difficile* se ha visto que también es útil para descolonizar microorganismos multirresistentes. <sup>(1)(34)</sup>

Actualmente, se sabe que el TMF es una alternativa enfocada a la restauración de la microbiota intestinal, disminución o eliminación de patógenos colonizantes y por lo tanto puede disminuir el riesgo de infecciones, no obstante, hasta la fecha son pocos los ensayos clínicos que den a conocer una metodología estandarizada, menos invasiva, así como dosis y eficacia de la misma. <sup>(35)</sup>

El TMF es un campo en desarrollo con potencial terapéutico importante, por lo que este estudio permitió el desarrollo de esta línea de investigación a través de la estandarización del método y la elaboración de microbiota fecal liofilizada en cápsulas para la administración en pacientes colonizados por bacterias multirresistentes y/o *Clostridiodes difficile*, proporcionando información acerca de su eficacia en la descolonización de bacterias MDR y cambios en la taxonomía bacteriana de la microbiota intestinal.

## **1.5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿El TMF liofilizada y encapsulada puede generar cambios en la microbiota intestinal de pacientes colonizados por bacterias multirresistentes y/o *C. difficile*?

## **1.6 HIPÓTESIS**

El TMF liofilizada y encapsulada generará cambios en la microbiota intestinal de pacientes colonizados por bacterias multirresistentes y/o *C. difficile*.

## CAPITULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 *Clostridiodes difficile*

Bacilo gram positivo, esporulado, anaerobio estricto, que puede o no producir toxinas. Fue descrito por primera vez como *Bacillus difficile* en 1935 por Halle y O'toole en heces de recién nacidos, pero fue hasta 1978 que se le relacionó con colitis pseudomembranosa.

*C. difficile* crece en agar cicloserina-cefoxitin-fructosa y forma colonias amarillentas con olor característico a estiércol de caballo. Actualmente, su proliferación intestinal se ha relacionado con el consumo de antibióticos y alteración de la microbiota intestinal siendo causa de elevada morbimortalidad. <sup>(6)(7)(8)(10)(18)</sup>

#### 2.2 Epidemiología de *Clostridiodes difficile*

*C. difficile* se encuentra como parte de la microbiota intestinal normal en el 50% de recién nacidos, 1-3% en la comunidad y en más del 20% de los adultos hospitalizados; es la principal causa de diarrea en este último grupo. Sin embargo, en los últimos años se han descrito mayor número de episodios en la comunidad con una mortalidad que varía del 1-5%. <sup>(18)</sup>

La epidemiología de infección por *C. difficile* ha variado a lo largo del tiempo, en el año 2000 Estados Unidos reportó más de 150,000 casos, incrementando su número entre los años 2002 y 2006 a 300,000 al igual que en Canadá y Europa como resultado de la aparición de la cepa hipervirulenta NAP01/RT027. <sup>(7)(51)</sup>

En 2017 los CDC reportaron al menos 223,000 casos de *C. difficile* con 12,800 muertes, <sup>(52)</sup> en España su tasa de incidencia fue de 228 casos/100,000 habitantes internados en hospitales y centros geriátricos. <sup>(6)(52)</sup>

En México, los casos de infección por *C. difficile* se han incrementado en los últimos años, mostrando cifras similares a Estados Unidos y Europa con una alta proporción de infecciones causadas por el ribotipo 027 y mortalidad del 10%. <sup>(9)(53)</sup>



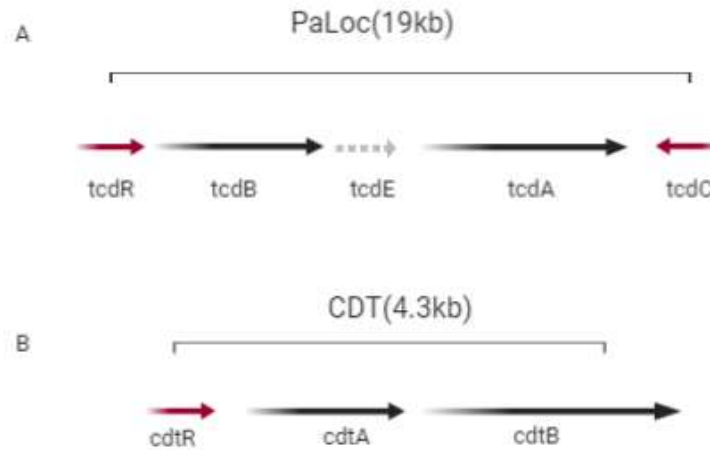
## 2.3 Factores de virulencia de *Clostridioides difficile*

**Locus de Patogenicidad (PaLoc):** está formado por 5 genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR*, *tcdE*) y mide aproximadamente 19.6 kilobases.

- Gen *tcdA*: codifica para la toxina A (TcdA), enterotoxina de 308 kilodaltones (kDa).
- Gen *tcdB* codifica para la toxina B (TcdB), citotoxina de 270 kDa.
- Gen *tcdR*: codifica para la proteína TcdR, es un factor transcripcional crítico para la expresión de los genes de la toxina, se encarga de activar la RNA polimerasa.
- Gen *tcdC*: codifica para la proteína TcdC, es un regulador negativo de la expresión de la toxina, bloquea la asociación de TcdR con la RNA polimerasa.
- Gen *tcdE*: codifica para la proteína TcdE, es un facilitador de la secreción de las toxinas desde las células, codifica una holina que se encarga de hacer poros en la membrana citoplasmática.

En los últimos años se ha aislado una tercera toxina conocida como toxina binaria o transferasa de *C. difficile* (CDT) la cual está codificada por dos genes *cdtA* y *cdtB* que se encuentran fuera del PaLoc. Figura 1.

Estudios *in vitro* indican que la producción de estas toxinas son las responsables del daño intestinal durante la infección y se incrementan bajo condiciones de estrés como la administración de antibióticos. <sup>(13)(16)(19)(20)</sup>



**Figura1. Esquema de PaLoc (locus de patogenicidad).** A) Genes que codifican las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*), genes reguladores (*tcdR* y *tcdC*), gen que codifica para holina (*tcdE*) B) Región que codifica la transferasa de *C. difficile*. Tomado y modificado de Drudy D. (2007). Intern J Infect Dis.

### Toxinas TcdA y TcdB:

Son citotoxinas con actividad de tipo glucosiltransferasa que causan la interrupción de la síntesis de las fibras de actina del citoesqueleto lo que ocasiona reducción de la resistencia transepitelial, acumulación de líquido y posteriormente la destrucción del epitelio intestinal.

Las toxinas se unen a sus receptores (disacárido Gal 1-4 GlcNAc para TcdA) e ingresan a las células a través de endocitosis, ya en los endosomas con un ambiente ácido desencadenan la proteólisis en la región amino terminal la cual se atribuye como región catalítica que separa al resto de la toxina, se libera el citosol que cumple su función de glucosilación en ciertas guanosin trifosfatasas (GTPasas), a nivel de treonina 37 para la proteína Rho, treonina 35 para la proteína Rac. Estas GTPasas están encargadas de la regulación de procesos de señalización para el mantenimiento de la barrera epitelial, la formación del citoesqueleto, intervienen en la fagocitosis y producen citocinas; de esta manera la toxina participa en la alteración de las uniones intercelulares de la barrera epitelial, desestructuración y muerte celular, desencadenando la migración de células blancas hacia el lumen intestinal, inflamación y estimulando la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en macrófagos activados.

La toxina TcdA actúa sobre los macrófagos, monocitos y mastocitos causando la liberación de citocinas proinflamatorias como interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ;

IL-1 y el TNF- $\alpha$ , estimulan la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), a través de la vía de activación de la fosfolipasa A2 y de la ciclooxigenasa 2, lo que ocasiona un incremento en la secreción de agua y electrolitos hacia el lumen intestinal. Anteriormente, se pensaba que la toxina TcdB no causaba daño en el intestino a menos que TcdA estuviera presente, no obstante, el número de casos por cepas de *C. difficile* TcdA negativas y TcdB positivas se ha incrementado. <sup>(7)(10)(16)(21)(23)</sup>

### **Toxina Transferasa de *Clostridiodes difficile* (CDT)**

La toxina transferasa es denominada también toxina binaria, está conformada por un dominio de 48 kDa que ejerce su función como una ADP-ribosiltransferasa (CDTa) y otro dominio de unión de 99 kDa (CDTb) que suscita la entrada de la CDTa a la célula hospedera. Aunque su mecanismo de acción no está del todo esclarecido, se ha observado mayor toxicidad de *C. difficile* ya que incrementa su adhesión a las células intestinales y altera la estructura del citoesqueleto con el resultado del incremento en su diseminación. <sup>(23)</sup>

### **Flagelos**

*C. difficile* presenta dos genes que codifican para sus flagelos peritricos los cuales le confieren movilidad.

- *Gen fliC*: codifica una proteína de 39 kDa, denominada flagelina que forma parte de la estructura del flagelo.
- *Gen fliD*: codifica una proteína de 56 kDa, denominada CAP, la cual tiene la función del anclaje del flagelo a la membrana bacteriana. <sup>(24)</sup>

### **Moléculas situadas en la superficie bacteriana**

- Proteína Cwp66 (*clostridial wall protein*): es una proteína de 66 kDa, la cual muestra propiedades de adhesina.
- Proteína Fbp68 (*fibronectin-binding protein*): es una proteína de 68 kDa, que facilita la unión bacteriana a la fibronectina.
- Capa S: formada por dos grupos de proteína de bajo peso molecular (36 kDa) y alto peso molecular (45 kDa), actúa como adhesina. <sup>(7) (25)</sup>

## Enzimas hidrolíticas

- Hialuronidasa: hidroliza el ácido hialurónico de la matriz extracelular y produce N-acetilglucosamina, la cual es necesaria para el metabolismo de *C. difficile*.
- Condroitina 4-sulfatasa, gelatinasa, colagenasa y L-prolina-aminopeptidasa: incrementan la disponibilidad de nutrientes en el intestino promoviendo el crecimiento del microorganismo.

**Cápsula:** le confiere actividad antifagocitaria <sup>(25)</sup>

### 2.4 Infección por *Clostridiodes difficile*

Existen diferentes definiciones para la infección por *C. difficile*, según la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA por sus siglas en inglés) se requiere la combinación de los síntomas de CDI, presencia de una cepa toxigénica con la detección de toxinas en heces o evidencia histopatológica de colitis pseudomembranosa. La Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID por sus siglas en inglés) define la infección como un síndrome que se caracteriza por dolor abdominal como resultado de la producción de toxinas, aumento en el número de deposiciones (3 ó más en 24 horas), el cambio característico de su consistencia definido en la escala de Bristol como el tipo 5, 6 ó 7 y fiebre persistente. <sup>(10)</sup> La CDI puede ocurrir en pacientes colonizados por *C. difficile* toxigénico o en quienes se hayan infectado por primera vez. <sup>(12)</sup> La transmisión de la infección es por ingestión de esporas vía fecal-oral, puede ocurrir de persona a persona o por contaminación en el ambiente; también existen otras fuentes como pacientes colonizados pero asintomáticos, animales, agua y alimentos contaminados. Las esporas pueden vivir en ambientes adversos y son resistentes a desinfectantes, es por ello su elevada prevalencia en medios hospitalarios. <sup>(11)(18)</sup>

Es importante mencionar que un considerable porcentaje de recidivas, hasta un 20% después del primer episodio y hasta 40-60% después del segundo episodio. <sup>(3)(11)</sup>

## 2.5 Factores de Riesgo asociados a la infección por *Clostridiodes difficile* <sup>(9,53)</sup>

Se han considerado los siguientes riesgos asociados a enfermedad:

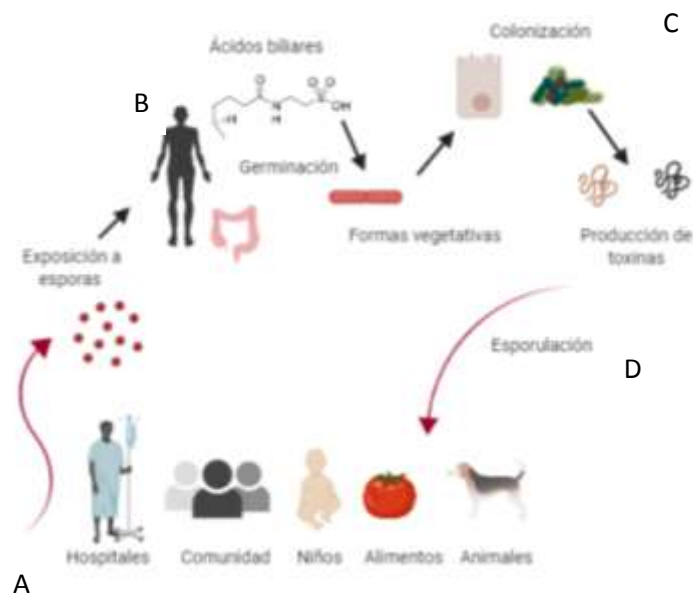
- Consumo de antibióticos y la consecuente alteración de la microbiota intestinal
- Edad mayor a 65 años
- Pacientes inmunosuprimidos
- Estancia hospitalaria prolongada
- Enfermedad inflamatoria intestinal
- Uso de supresores de acidez gástrica
- Sexo masculino
- Etnia caucásica
- Cirugía gastrointestinal previa
- Comorbilidades
- Inmunodeficiencia e infección por virus de la inmunodeficiencia humana(VIH)
- Malnutrición
- Neoplasias
- Diabetes mellitus
- Uso prolongado de antibióticos
- Uso de esteroides

## 2.6 Patogenia de la diarrea asociada a *Clostridiodes difficile*

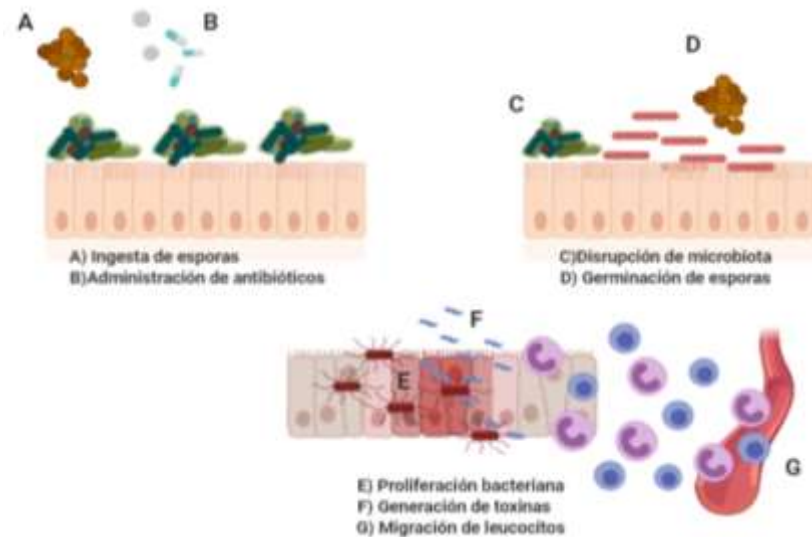
La patogenia de la diarrea asociada a *C. difficile* involucra disbiosis intestinal, considerada como la causa principal para el desarrollo de la infección y la ingesta de esporas de la bacteria. La mayor parte de formas vegetativas ingeridas son eliminadas en el estómago por la acción de los jugos gástricos, sin embargo, las esporas resistentes a la acidez gástrica pueden germinar en el intestino delgado, transformarse en células vegetativas y colonizar el tracto gastrointestinal.

La germinación depende de varios factores, entre los cuales destaca la presencia de ácidos biliares primarios como el taurocolato; contrario a los efectos de ácidos biliares secundarios como el quenodeoxicolato que inhibe este proceso. Posteriormente, al

llegar las esporas al colon en un ambiente anaerobio pueden proliferar, colonizar, adherirse, invadir la mucosa intestinal y producir toxinas, las cuales a través de la inactivación de GTPasas inician una serie de fenómenos que culminan con la pérdida de la función de barrera que poseen las células epiteliales, producen inflamación, aumento de la permeabilidad epitelial, producción de citocinas, migración e infiltración de neutrófilos y linfocitos, aparición de diarrea y la formación de pseudomembranas. La aparición de estas pseudomembranas (conformadas por fibrina, leucocitos, moco y restos celulares) se relaciona con la evolución de la enfermedad. Figuras 2 y 3<sup>(9)(10)(11)</sup>  
(12)(13)(18)



**Figura 2. Ciclo de Infección por *Clostridiodes difficile*:** Las esporas pueden provenir de diferentes fuentes (A), después de la exposición a las esporas se produce su germinación en el intestino grueso a través de los ácidos biliares primarios con su consiguiente transformación a células vegetativas (B), las bacterias colonizan, proliferan y producen las toxinas que desencadenaran los síntomas en el individuo (C) Se generan esporas y el ciclo se repite (D). Tomado y modificado de Seekatz A. (2014). J Clin Invest.



**Figura 3. Patogénesis de *Clostridioides difficile*:** Después de la ingestión de esporas y la administración previa de antibióticos (A) (B) se produce la disrupción de la microbiota intestinal la cual elimina la resistencia a la colonización y permite la germinación de las esporas (C) (D). Las células vegetativas comienzan a producir las toxinas ocasionando daño epitelial, aumento de la permeabilidad, migración de leucocitos y la sintomatología clínica (E) (F) (G). Tomado y modificado de Seekatz A. (2014). J Clin Invest.

### 2.7 Manifestaciones clínicas de la infección por *Clostridioides difficile*:

El cuadro clínico de la CDI tiene distintos grados de severidad, desde leve hasta fulminante.

La diarrea es la principal manifestación, puede aparecer al haber concluido la terapia con antibióticos o inclusive diez semanas después. La consistencia de las heces puede variar de blanda pastosa a totalmente líquida de tipo abundante, acuosa o mucosa y en algunas ocasiones con sangre. La fiebre se presenta en 80% de los pacientes y el dolor abdominal en el 70%, éste puede aparecer como leves retortijones o un dolor intenso. En los estudios del laboratorio se puede observar leucocitosis, inclusive reacciones leucemioides, hipoalbuminemia y aumento de la proteína C reactiva. <sup>(14)(18)</sup>

### 2.8 Diagnóstico de la enfermedad por *Clostridioides difficile*

El diagnóstico se fundamenta en la combinación de la clínica y el laboratorio, teniendo en cuenta la presencia de tres o más evacuaciones sin otra causa aparente y la identificación de la bacteria con presencia de sus toxinas. La colonoscopia con identificación de pseudomembranas también es válida indicando una infección más avanzada.

Dentro de las pruebas de laboratorio se encuentra el Ensayo de Neutralización de Citotoxicidad Celular (CCNA), el cual es considerado como el estándar de oro para el diagnóstico de CDI debido a su alta especificidad y la detección directa de la toxina, sin embargo, no detecta a la bacteria per se y requiere de un procedimiento laborioso y tardado. Otra de las pruebas utilizadas es el cultivo toxigénico, el cual incluye el cultivo del microorganismo seguido de la detección de las toxinas a través de inmunoensayo, CCNA o la amplificación de ácidos nucleicos (NAAT), pero al igual que el CCNA demanda un mayor tiempo y trabajo; es por ello que actualmente se realizan pruebas rápidas descritas en algoritmos que faciliten la detección oportuna de *C. difficile* y permitan la diferenciación de un individuo colonizado de uno enfermo. La detección de la enzima Glutamato Deshidrogenasa (GDH) presente en todas las cepas de *C. difficile* y posteriormente la detección de los genes que codifican las toxinas mediante la amplificación de ácidos nucleicos como la PCR. <sup>(6) (8) (10) (13) (18)</sup>

## **2.9 Tratamiento para la Infección por *Clostridiodes difficile***

El manejo incluye suspensión o cambio del antibiótico asociado, hidratación y la administración de tratamiento de primera línea como metronidazol oral o vancomicina, el tratamiento varía según el grado de severidad de la enfermedad.

Para episodios recurrentes se utiliza metronidazol, vancomicina y fidaxomicina, ésta última solo se encuentra en algunos países.

Una alternativa que se ha propuesto para las recurrencias de CDI es el anticuerpo monoclonal bezlotoxumab, el cual proporciona inmunidad pasiva contra la toxina B al bloquear su unión a las células del hospedero, sin embargo, el costo del mismo ha limitado su uso. <sup>(74)</sup> En la actualidad el TMF es un procedimiento aceptado como alternativa para tratar de forma eficaz las recurrencias ocasionadas por la CDI, pero existen diferentes criterios para su vía de administración. <sup>(18)</sup>

## **2.10 Cepa NAP1 B1 027**

Su nombre refiere las técnicas de análisis molecular a la que fue sometida para su identificación, caracterizada como grupo B1 por el análisis de restricción con endonucleasas (REA), tipo NAP1 por electroforesis en gel en campo pulsado 1 Norte Americano y ribotipo 027 por la técnica basada en el polimorfismo de la amplificación de fragmentos de una región de los genes 16S al 23S del rRNA.



La importancia de esta cepa inició en el año 2000 en Estados Unidos ya que incrementó significativamente la morbimortalidad y recurrencia de los casos asociados a infección por *C. difficile*, volviéndose pandémica y afectando principalmente a Canadá, Europa y Reino Unido.

Esta cepa presenta una variación en el gen que actúa como represor (*tcdC*) y desencadena hiperproducción de toxinas A y B (cepa hipervirulenta).<sup>(54)</sup>

En América Latina, se reportó el primer caso en 2010 en Costa Rica y en México su impacto se vio reflejado con una tasa del 39% en la severidad y recurrencia, así lo reportó un estudio realizado en un hospital de tercer nivel donde se encontró que los pacientes infectados con RT027 presentaban respuesta tardía al tratamiento y a la historia de un procedimiento gastrointestinal (endoscopia) como factor de riesgo adicional a los atribuidos para las cepas convencionales. La mortalidad reportada en este estudio fue del 5%.<sup>(55)</sup>

### **2.11 Colonización por *Clostridiodes difficile***

Los criterios para definir la colonización varían, sin embargo, se basa principalmente en la detección de la bacteria o toxinas y la ausencia de síntomas relacionados a infección. Actualmente, se considera de importancia clínica ya que datos recientes sugieren que pacientes asintomáticos contribuyen a la propagación de esporas y juegan un papel importante en la transmisión, además de aumentar el riesgo de desarrollar enfermedad ya que el estado de colonización de un paciente puede avanzar a infección por varios factores como la disbiosis intestinal, inmunosupresión, exposición hospitalaria prolongada y uso de antibióticos.<sup>(10) (15)</sup>

### **2.12 Epidemiología de la colonización por *Clostridiodes difficile***

La colonización es diferente entre las diferentes poblaciones y zonas geográficas que han sido estudiadas.

En población pediátrica, el porcentaje varía desde el 37% hasta el 71% en el primer año de vida con la identificación de cepas toxigénicas y ribotipos asociados a CDI y disminuye en 15% en niños de 1 a 8 años. Pese a este elevado porcentaje existe un mínimo de casos de infección reportados por lo que se considera a este grupo de

estudio una fuente de transmisión importante. En adultos sanos el porcentaje de colonización oscila entre 4-15% con al menos 70% de cepas toxigénicas.

En pacientes de nuevo ingreso en los hospitales ocurre en 3 a 21% e incrementa notablemente a 51% en residentes de casas de salud con estancia prolongada; varios estudios demostraron que hasta un 37% de esta población están colonizados por cepas toxigénicas entre las que destaca RT027/NAP1.

Los trabajadores de la salud se consideran una fuente potencial de transmisión debido al contacto frecuente con los pacientes, sin embargo, los porcentajes reportados en distintos estudios son de 0% al 13%. <sup>(10)</sup> <sup>(15)</sup>

### **2.13 Principales Reservorios de *Clostridiodes difficile***

#### **Reservorio humano:**

- Pacientes con diarrea por *C. difficile*
- Piel, heces y ambiente del paciente post tratamiento (nivel de contaminación: 58%, 56% y 50% respectivamente)
- Portadores asintomáticos

#### **Reservorio animal y ambiental:**

- Animales domésticos y de granja pueden desarrollar diarrea o ser portadores asintomáticos, varios estudios han reportado de 11-40% en animales de compañía como perros y gatos; además se han visto relaciones clonales entre cepas de cerdos y humanos en un 42%.
- Desde la detección de *C. difficile* en animales de granja se han elaborado estudios en comida, principalmente en carne de cerdo, res, pavo de distintos comercios; con una frecuencia entre 20 a 63% en EEUU y Canadá; a diferencia de países europeos donde la frecuencia va de 0 a 6.3%; en México no se ha reportado.
- El ambiente, es otro de los principales reservorios ya que las esporas al ser resistentes al calor, desecación y desinfectantes prevalecen en la mayoría de superficies hospitalarias como pisos, baños, camas, mesas, etc. A nivel de

comunidad se ha reportado contaminación en agua, suelo, clínicas veterinarias e, incluso en casas particulares. <sup>(10)</sup>

## **2.14 Mecanismos de Colonización de *Clostridiodes difficile***

### **2.14.1 Disrupción de microbiota**

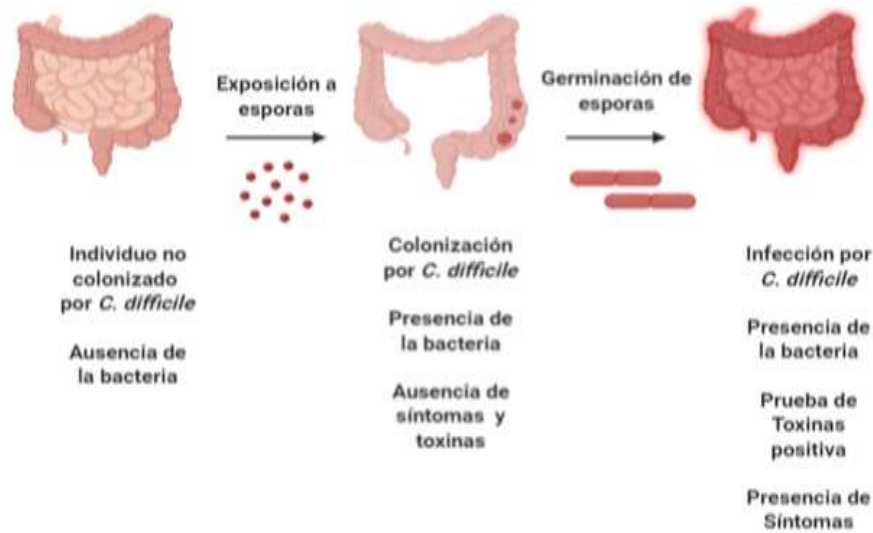
La disrupción de la microbiota es un factor sumamente importante para la patogénesis de *C. difficile*, ya que se ha demostrado que una microbiota equilibrada protege al individuo de la colonización por patógenos, lo cual se conoce como resistencia a la colonización; ésta confiere protección principalmente a través de la competencia por nutrientes y nichos.

La pérdida de la resistencia puede ocasionar el incremento de algunas especies bacterianas perjudiciales para el hospedero y el uso de antibióticos es un factor muy relevante, entre los que se reportan en la literatura destacan clindamicina, cefalosporinas y penicilinas. La disminución de la diversidad microbiana puede ser detectada en pocos días de terapia antimicrobiana, mientras que cambios en la composición dependen en gran parte del tipo de antibiótico y de la comunidad bacteriana del hospedero.

La microbiota intestinal se encarga de la transformación de ácidos biliares primarios a secundarios, los cuales se han involucrado en la represión de la germinación y generación de esporas de *C. difficile*. Las principales alteraciones en la composición de la microbiota intestinal han sido descritas en pacientes con CDI, donde se ha visto disminución de los phyla *Bacteroidetes* y *Firmicutes* especialmente las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae*, además de incremento del phylum *Proteobacteria* y el Orden *Lactobacillales*; sin embargo, en algunos estudios realizados en pacientes colonizados se observó aumento en *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y un mínimo porcentaje de *Proteobacterias*. <sup>(10) (11) (17)</sup>

## **2.15 Pruebas de laboratorio para detectar colonización**

La colonización por *C. difficile* puede detectarse por los mismos métodos de diagnóstico, como cultivo, enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) y PCR para toxinas.



**Figura 4. Colonización por Clostridioides difficile:** un individuo no colonizado puede adquirir las esporas de *C. difficile*, presentar prueba positiva de GDH que indica la presencia de la bacteria pero ausencia de toxinas y síntomas. Tomado y modificado de Crobach M. (2018) Clin Microbiol Rev.

## 2.16 Microbiota intestinal

La palabra microbiota se refiere al conjunto de microorganismos de un entorno que han sido identificados taxonómicamente e incluye bacterias, virus, hongos y arqueas; esta comunidad vive armónicamente en una relación de mutualismo con su hospedero hasta la muerte.

La microbiota del tracto gastrointestinal se encuentra distribuida en diferentes proporciones a lo largo del tubo digestivo, residiendo en menor cantidad en el jugo gástrico donde existen alrededor de  $10^3$  bacterias por mL,  $10^4$  bacterias/mL en el duodeno y  $10^{11}$  ó  $10^{12}$  bacterias/mL en el colon; la microbiota se adquiere inmediatamente después del nacimiento. Actualmente, se ha correlacionado la microbiota intestinal con el metabolismo, estructura, diversidad y composición con el estado de salud de las personas. <sup>(26)(27)(28)(29)(30)</sup>

### Composición de la microbiota intestinal

La microbiota la adquirimos al momento de nacer, inicialmente *Lactobacillus* y enterobacterias se establecen en el tubo digestivo, posteriormente existe predominio de *Firmicutes* (40-70%) *Bacteroidetes* (25%), *Bifidobacterium*, *Clostridial*, *Actinobacteria* y

Eubacteria, manteniendo un perfil estable hasta los dos años de edad y se mantiene a lo largo de la vida, variando de un individuo a otro. <sup>(26)(27)(28)(29)(30)</sup>

### **Factores que influyen en la composición de la microbiota** <sup>(26)(27)(28)(29)(30)</sup>

- El tipo de nacimiento: vaginal o cesárea
- Tipo de alimentación al nacer: leche materna o fórmula
- Nivel de higiene
- Exposición al ambiente natural
- Genética
- Alimentación en la vida adulta: dieta alta en grasas, carne
- Uso de prebióticos, probióticos o simbióticos
- Ingesta de antibióticos, antiinflamatorios, supresores de la acidez gástrica, hipoglicemiantes
- Ingesta de alcohol
- Edad
- Sexo
- Estrés
- Desórdenes intestinales
- Enfermedades infecciosas, metabólicas, neurológicas
- Estilo de vida

### **Funciones de la microbiota intestinal**

- **Nutrición y metabolismo**

Las bacterias presentes en el intestino producen enzimas y proteínas, cuya función principal es fermentar residuos de la dieta que no han sido digeridos y sintetizar vitaminas. La fermentación de hidratos de carbono producida por las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* da origen a ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como el ácido butírico que actúa como la principal fuente de energía para el epitelio del colon y contiene propiedades antitumorales, también ácido acético y propiónico los cuales regulan el metabolismo de la glucosa.

Otra de las funciones importantes que cumple la microbiota intestinal es la transformación de ácidos biliares primarios (cólico y quenodeoxicólico) a secundarios

(deoxicólico y litocólico) a través de las enzimas 7 $\alpha$  dihidroxilantes producidas por miembros de las familias *Lachnospiraceae* (*Clostridium scindens*), *Ruminococcaceae* y *Blautia* las cuales pertenecen al phylum *Firmicutes*. Dicha transformación es de vital importancia ya que los ácidos biliares primarios estimulan la germinación de *C. difficile* favoreciendo la infección. <sup>(26)(27)</sup>

## Protección

- **Resistencia a la colonización:** Impide la invasión de microorganismos patógenos al hacer el efecto barrera, el cual permite a las bacterias residentes ocupen sus nichos ecológicos, administren, consuman y agoten los recursos existentes para reprimir la proliferación de bacterias exógenas potencialmente patógenas. Un ejemplo de ello es *Bacteroides thetaiotaomicron* el cual consume y regula la fucosa producida por el hospedero y de esta manera evita que ésta sea utilizada por bacterias oportunistas.

Otro mecanismo de protección es la generación de ácidos grasos volátiles y bacteriocinas con efecto antimicrobiano que inhiben el crecimiento de bacterias no comensales, así como la reducción de pH producida por la generación de SCFAs.

- **Trófica:** interviene en la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal. <sup>(10)(26)</sup>
- **Inmunológica:** interviene en el desarrollo y maduración del sistema inmune con la generación de inmunoglobulinas y tolerancia a antígenos. <sup>(27)(29)</sup>

## 2.17 Disbiosis Intestinal

Es la pérdida de la relación de mutualismo entre la comunidad bacteriana, sus productos metabólicos y el sistema inmune del hospedero.

La disbiosis intestinal es la disminución de la diversidad bacteriana y sobre crecimiento de especies llamadas patobiontes, los cuales son variantes patogénicas de la microbiota.

Actualmente, existen diferentes estrategias para restablecer la microbiota intestinal (eubiosis), entre ellas destacan el uso de probióticos, prebióticos, trasplante de un consorcio bacteriano (BCT) el cual consiste en trasplantar una sola familia o especie de bacterias y el trasplante de microbiota fecal que se ha visto enfocado como una

alternativa para el tratamiento especialmente de infecciones por *C. difficile* y bacterias resistentes. <sup>(26)</sup>

### **2.18 Microorganismos resistentes a los antimicrobianos**

El aumento de infecciones con microorganismos resistentes se considera un desafío importante a nivel de salud pública ya que están asociadas a una elevada mortalidad y un impacto económico importante. Los CDC han reportado que cada año aproximadamente 23.000 personas mueren a causa de una infección por bacterias resistentes, siendo EBLEE, ERV, ERC y *C. difficile* citados por los mismos centros como amenazas serias. <sup>(43) (47)</sup>

Así mismo se ha descrito una relación entre los antibióticos, la microbiota intestinal y estas bacterias, las cuales pueden ser colonizadoras del tracto gastrointestinal. El principal efecto negativo de los antibióticos es la destrucción de anaerobios que forman parte la microbiota intestinal y el aumento de la densidad de bacterias patógenas resistentes.

La colonización de bacterias multirresistentes no es causa directa de enfermedad, sin embargo, se sugiere que la pérdida de la resistencia a la colonización, expansión y translocación de bacterias patógenas ocasiona una mayor probabilidad de desarrollar infecciones; las cuales se han reportado en tracto urinario y torrente sanguíneo.

Es por ello que actualmente el TMF ha tomado importancia y aunque la mayoría de estudios reportan su utilización como tratamiento para la infección por *C. difficile* se ha visto que también es útil para descolonizar estos microorganismos. <sup>(1)(34)(35)</sup>

### **2.19 Trasplante de Microbiota Fecal**

También conocido como bacterioterapia fecal, es un procedimiento que se ha utilizado desde siglos pasados. En 1958 Ben Eiseman realizó el primer trasplante para tratar colitis pseudomembranosa y en 1983, fue utilizado en diarrea por infección de *C. difficile*. <sup>(10)(11)(26)</sup>

El TMF consiste en trasplantar heces de un donador sano a un receptor con el objetivo de restaurar la microbiota intestinal normal y la resistencia a la colonización, así como eliminar las comunidades de bacterias resistentes y/o *C.difficile*. <sup>(11)</sup>

La mayoría de estudios en donde se aplica el TMF, están relacionados con pacientes con CDI recurrente, en donde se describe resolución del 90%, sin embargo, existen ciertas dificultades prácticas y estéticas en este método; entre las más comunes se encuentran el reclutamiento y tamizaje de un donador sano lo cual lleva tiempo y costo elevado, procesamiento no estandarizado de la muestra y las rutas de administración (sonda nasogástrica, enema) consideradas como procedimientos invasivos y los cuales requieren que la materia fecal tenga un máximo de 6 horas de haber sido procesada, no obstante una nueva vía de administración fue establecida por Youngster y cols., usando cápsulas de hipromelosa por vía oral lo cual facilitó el procedimiento. <sup>(31) (32) (33)</sup>

Investigaciones recientes demostraron que posterior al TMF ocurre un cambio rápido y significativo en la composición de la microbiota del receptor y se asemeja en gran proporción a la microbiota del donador, aunque el TMF puede verse como algo sencillo, involucra riesgos que deben tenerse en cuenta especialmente en la evaluación de posibles transmisiones de enfermedades infecciosas, por lo que todo posible donador debe ser evaluado a través de pruebas sanguíneas y de heces. De acuerdo a protocolos actuales algunas de las pruebas que se deben realizar son la detección de virus de hepatitis A, B, C, D, E, HIV, *Treponema pallidum*, *C. difficile*, parásitos, virus, bacterias que pueden ocasionar infecciones gastrointestinales y la microbiota del donador. <sup>(26)(31)</sup>



## **CAPITULO III**

### **3. OBJETIVOS**

**3.1. Objetivo General:** Estandarizar el proceso de elaboración de cápsulas de microbiota fecal liofilizada para trasplante en pacientes colonizados por bacterias multirresistentes y/o *C. difficile* y evaluar los cambios en la descolonización y microbiota intestinal.

#### **3.2 Objetivos Secundarios:**

- Seleccionar donadores clínicamente sanos para obtención de la microbiota fecal
- Estandarizar el proceso de la materia fecal para su liofilización, la elaboración de cápsulas con la determinación de bacterias viables y las condiciones de almacenamiento de las cápsulas
- Determinar la microbiota basal de los donadores y de los pacientes incluidos en el estudio
- Analizar los cambios de la microbiota en la descolonización posterior a la administración de cápsulas a los 14 días posteriores al TMF en los grupos de estudio
- Determinar la dosis de cápsulas necesarias para la descolonización de los organismos MDR y/o *C. difficile*.

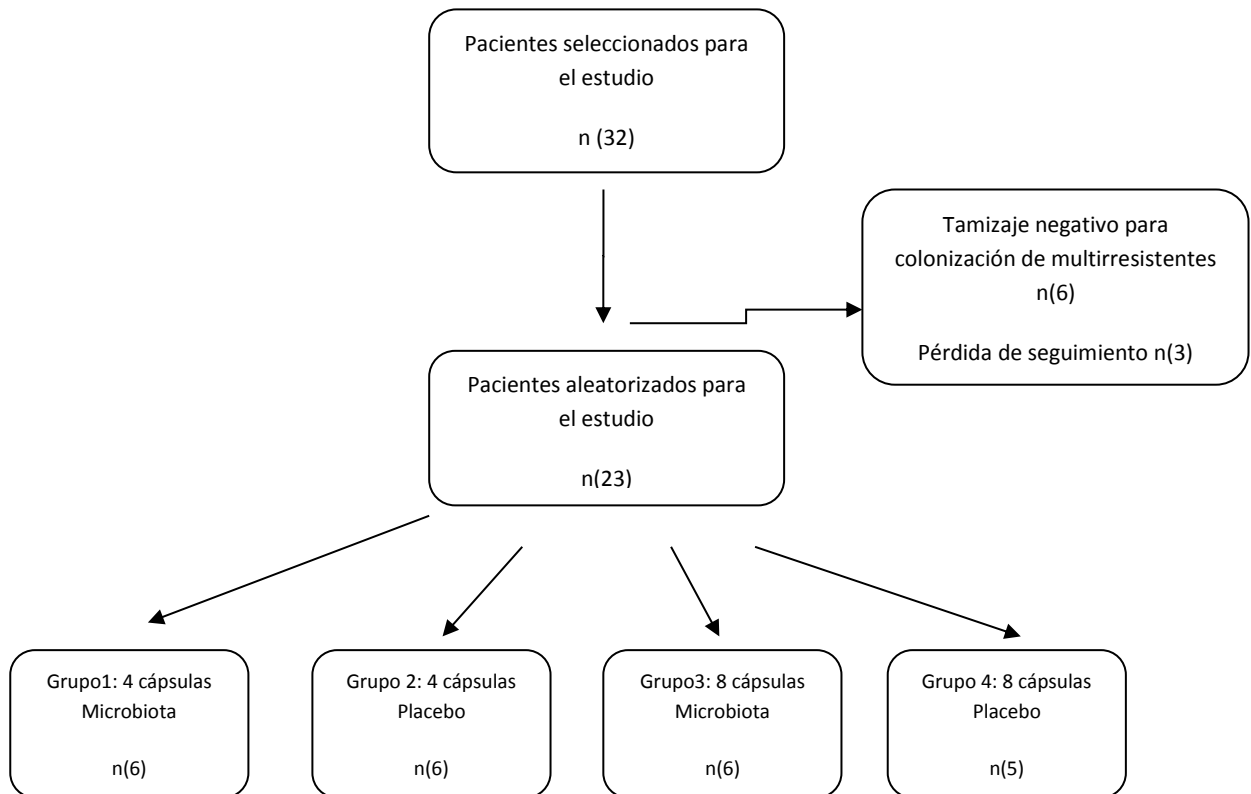
## CAPITULO IV

### 4. MÉTODO

**4.1 Tipo de estudio:** Estudio piloto clínico controlado aleatorizado cegado.

**4.2 Población de estudio:** Pacientes hospitalizados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en el período de marzo de 2019 a marzo de 2020.

**4.3 Tamaño de muestra:** Para este estudio piloto, se calculó con base a lo reportado en la literatura donde se recomienda utilizar el 9% (32 pacientes) del tamaño de la muestra total del estudio original, que es de 360 pacientes.<sup>(66)</sup> Se aleatorizó en bloques de 8 a los 32 pacientes en el programa de cómputo Randomization Plan 2017 para establecer 4 grupos.



**Figura 5. Diagrama de flujo para selección y aleatorización de pacientes para el estudio piloto. Se reclutaron 23 pacientes durante el periodo de estudio.**

## **Criterios de Selección del Donador Universal**

### **Criterios de inclusión**

- Hombre o mujer > 18 años y < 50
- Índice de Masa Corporal (IMC)  $\leq$  25
- Peso mínimo de 50 kg
- Buen estado de salud general
- Sin consumo de antibióticos e inhibidores de protones al menos durante los últimos 6 meses
- Sin exposición al ambiente hospitalario
- Hábitos intestinales regulares
- Sin toxicomanías: no haber ingerido bebidas alcohólicas en las últimas 48 horas
- Sin antecedentes de epilepsia, hepatitis, sífilis, paludismo, cáncer, sida o enfermedades del corazón
- Sin antecedentes de cualquier tipo de cirugía en los últimos 6 meses
- No haberse realizado tatuaje, perforación o acupuntura en el último año
- Que acepte participar en el estudio y firme el consentimiento informado

### **Criterios de exclusión**

- Contacto sexual de riesgo en los últimos 6 meses
- Presencia de tatuajes realizados en los últimos 6 meses
- Alergias alimentarias de cualquier tipo
- Presencia de enfermedades crónico-degenerativas
- Antecedentes heredo-familiares de primera línea de Diabetes Mellitus

### **Criterios de Eliminación**

- Presencia de alguna de las pruebas de escrutinio positivas
- Colonización intestinal por bacterias MDR

## Criterios de Selección de pacientes para el trasplante de materia fecal

### Criterios de Inclusión

- Hombres y mujeres entre 18 y 65 años
- Estancia hospitalaria al menos de 72 horas
- Prueba positiva para bacterias MDR
- Prueba positiva para la enzima Glutamato Deshidrogenasa
- Detección molecular de toxinas de *C. difficile* positiva
- Que hayan recibido al menos 4 dosis de alguno de los siguientes antibióticos: (piperacilina/tazobactam, imipenem, ertapenem, meropenem, ciprofloxacino, levofloxacino, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, vancomicina, linezolid, amikacina, daptomicina, trimetoprim sulfametoxazol.
- Que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado

### Criterios de Exclusión

- Cirugía reciente del tracto gastrointestinal
- Pacientes con neoplasias que recibirán quimioterapia en los siguientes 6 meses.

### Definiciones:

- **Tamizaje en heces:** se refiere a la búsqueda de bacterias multirresistentes como ERV, ERC, EBLEE con cultivo, así como la búsqueda de *C. difficile* a través de la detección de GDH y toxinas mediante el panel gastrointestinal de film array.
- **Tamizaje en sangre:** se refiere al análisis en sangre de los siguientes parámetros: Química sanguínea (Glucosa, urea, creatinina), perfil de lípidos (colesterol, triglicéridos, HDL, VLDL, LDL), perfil hepático: AST, ALT, Bilirrubina total, directa e indirecta, proteínas totales, albúmina, globulina, fosfatasa alcalina, hemoglobina glucosilada, biometría hemática, proteína C reactiva, VIH, VDRL, Virus de hepatitis A, B, C.

- **Índice de Shannon:** es una medida utilizada para evaluar diversidad bacteriana (composición y número) en un sitio específico basado en el número de OTUs encontradas. <sup>(67)</sup>
- **OTU:** es la unidad taxonómica operacional basada en la similitud de secuencias dentro de un conjunto de datos que permite agrupar secuencias de poblaciones microbianas. <sup>(68)</sup>

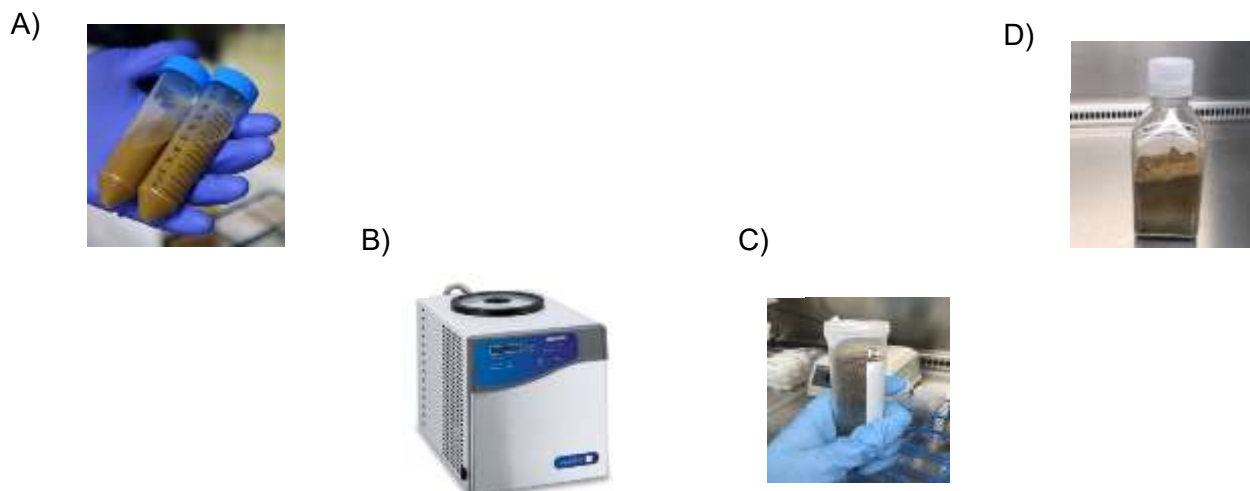
## 4.7 METODOLOGÍA:

### 4.7.1 Estandarización del tratamiento de heces:

- Las heces se pesaron en la balanza granataria explorer (Ohaus, NJ, USA) y por cada 50 gramos se agregaron 250 ml de solución salina estéril al 0,89%, se homogenizó y mezcló en una licuadora y posteriormente se filtró con gasas para eliminar las partículas grandes.
- La muestra fue centrifugada a 4500 rpm por 25 minutos y se desechó el sobrenadante. Se re suspendió el sedimento con solución salina al 0.89%, por cada 50 gramos de heces se agregaron 125ml de solución salina y se agregó sal de Trehalosa (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) hasta obtener una concentración final del 10%.
- Se agregaron 25 ml de la muestra con trehalosa al 10% en tubos falcon (Nest Biotechnology, Jiangsu, CN) de 50 ml y se congelaron a -80°C por 1 hora y posteriormente se colocaron en la liofilizadora.

### 4.7.2 Estandarización de la Liofilización de heces:

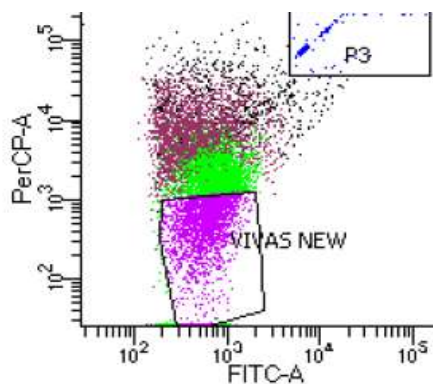
El proceso de liofilización se realizó en la liofilizadora Liter Benchtop (Labconco, Kansas, USA) a diferentes temperaturas (-40°C, -52°C) y se probaron tiempos de 6, 24, 28, 38, 48 y 72 horas, hasta obtener las heces liofilizadas sin ganancia de humedad a temperatura ambiente.



**Figura 6. Proceso de obtención de heces liofilizadas.** En donde se observa: A) heces previamente tratadas B) liofilizadora utilizada en el proceso C) heces liofilizadas y D) pool de heces previo encapsulado.

#### 4.7.3 Análisis de Viabilidad de Membrana y cuantificación de bacterias:

Para determinar el número de bacterias viables por cápsulas de heces liofilizadas se realizó el análisis de viabilidad de membrana con el kit Cell Viability (Becton Dickinson, CA, USA) según las instrucciones del fabricante mediante Citometría de flujo con el equipo FACS Canto II (Becton Dickinson). Se adquirió un total de 10,000 eventos y se aplicó la fórmula según instrucciones del fabricante tomando en cuenta el número de eventos de las células que fueron fluorescentes para Naranja de Tiazol (FITC-A) como se observa en la figura 7 que fueron 2755 células en 500mL y con el número de eventos de perlas que fueron 3410.



**Figura 7. Análisis de viabilidad de la microbiota liofilizada**

Fórmula para obtener el número de células vivas de la muestra:

$$\# \text{ de células vivas} = \frac{\# \text{ de eventos de células vivas} \times \# \text{ de perlas del tubo truecount} \times \text{dilución}}{\# \text{ de eventos de perlas} \times \text{Volumen de la dilución}}$$

#### 4.7.4 Estandarización de las cápsulas:

Se probaron los dos tipos de cápsulas una de gelatina (DR T&T, Corby, UK) y otra de hidroxipropilmetilcelulosa (Capsugel enteric Vcaps, Bornem, Be) en solución con pH= 1 y pH 8 para determinar el tiempo en que se liberaba el material de la cápsula, se midió el tiempo y se repitió el experimento por triplicado.

#### 4.7.5 Encapsulado de las heces liofilizadas

El encapsulado se realizó en una campana de bioseguridad 2A (ThermoFisher, Langensfeld, GA) con la encapsuladora semiautomática Profiller 1000 (Torpac, Maharashtra, In). Las cápsulas fueron llenadas a su capacidad con microbiota fecal liofilizada y posteriormente fueron pesadas en balanza granataria explorer (Oahus).



**Figura 8. Encapsulado de microbiota fecal:** las heces liofilizadas se encapsulan en la Profiller 1000 con capacidad de 100 cápsulas con 300 mg de heces liofilizadas. Se encapsulan de forma semiautomática.

#### 4.7.6 Almacenamiento de las cápsulas con microbiota fecal liofilizada:

Las cápsulas fueron almacenadas en diferentes temperaturas (-80°C, 4°C y 18°C) por un periodo de 30 días para evaluar su conservación y observar estabilidad.

#### 4.7 Proceso de muestras de materia fecal del donador universal

- a) Selección de donador universal. Se realizó mediante una entrevista y un cuestionario donde se solicitó información acerca de hábitos alimenticios, de vida y enfermedades familiares. (Anexo 1)
- b) Firma de consentimiento Informado por parte del donador (Anexo 2)
- c) Se solicitó una muestra de heces al donador para el tamizaje en heces:
  - Para la búsqueda de EVR, EBLEE y ERC se utilizó un tubo con 5ml de caldo soya tripticaseína (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Fr) más un disco de antibiótico (Becton Dickinson, Sparks, USA) de Vancomicina 10ug, uno de Ceftriaxona 30ug y Meropenem 10ug respectivamente más 10ul de la muestra de heces y se incubó por 24 horas a 35°C.
  - Posteriormente de cada tubo se inocularon 10ul, en agar base EVR (Oxoid, Basingstoke, UK) más sal de vancomicina (Sigma Aldrich) a una concentración de 8ug/ml, para el medio de ERC se agregó sal de meropenem (Sigma Aldrich) a una concentración de 8ug/ml y para el medio EBLEE se agregó sal de ceftriaxona (Sigma Aldrich) a una concentración de 4ug/ml, las placas se incubaron por 24 horas a 35°C.
  - Se identificaron los aislados obtenidos con tarjetas Vitek 2 GN (bioMerieux, Durjam NC, USA) y se realizó susceptibilidad con tarjetas Vitek 2 AST-N27 (bioMerieux,) en el Equipo Vitek 2 (bioMerieux). La interpretación de los resultados de susceptibilidad a cefalosporinas, carbapenémicos y vancomicina se realizaron con los criterios de la CLSI <sup>(70)</sup>.
  - La confirmación de la presencia de EBLEE se realizó con la prueba para BLEE en enterobacterias como lo marca la CLSI. <sup>(70)</sup>
  - La confirmación de la resistencia a carbapenémicos se realizó por mCIM como lo marca la CLSI. <sup>(70)</sup>
  - Se confirmó la resistencia a vancomicina por el método de microdilución en placa como lo marca la CLSI. <sup>(70)</sup>
  - Se realizó detección de la enzima GDH con el Panel Vidas C. difficile (bioMerieux) según instrucciones del fabricante en el equipo MiniVidas (bioMerieux)
  - Se utilizó el panel gastrointestinal Film Array gastrointestinal (BIOFIRE, Salt Lake City, Utah, USA) para la detección de otros posibles patógenos:



*Campylobacter*( *jejuni*, *coli*, *upsaliensis*), *Clostridium difficile* (Toxina A/B), *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* (especies *parahaemolyticus*, *vulnificus*, *cholerae*), *Escherichia coli* O:157, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* productora de toxina shiga (stx1-stx2), *E. coli* enteroinvasiva, Adenovirus F 40/41, Astrovirus, Norovirus GI-GII, Rotavirus A, Sapovirus I, II, IV, V, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.

- d) Se realizó tamizaje en sangre
- e) Se solicitó una nueva muestra de heces para su tratamiento, liofilización, encapsulado y análisis de microbiota intestinal por secuenciación del gen 16S rRNA.

#### **4.8 Proceso en pacientes que se reclutaron para recibir el TMF**

- a) La búsqueda de pacientes fue realizada por un médico, quien se basó en el censo de pacientes hospitalizados en el Instituto, evaluó su expediente clínico y criterios de selección establecidos. Así mismo cuando fueron seleccionados los invitó a participar en el estudio.
- b) Los pacientes que aceptaron formar parte del estudio firmaron consentimiento Informado (Anexo 3).
- c) Se realizó tamizaje en heces y análisis de la microbiota, previo al trasplante.
- d) Las cápsulas fueron administradas según el programa de aleatorización.
- e) Se realizó nuevamente el tamizaje en heces y análisis de microbiota, 14 días post trasplante. Firma de consentimiento Informado (Anexo 3)
- f) Se realizó tamizaje en heces y análisis de microbiota antes del trasplante y el día 14 post trasplante.

#### **4.9 Análisis de microbiota intestinal con la secuenciación del gen 16S rRNA**

- Se realizó la Extracción de DNA de las heces con el kit Qiamp DNA stool mini kit (Qiagen, Germantown, USA) según las instrucciones del fabricante.
- Se verificó la calidad y concentración en el equipo Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wisconsin, USA) y

- posteriormente en el equipo Qubit 3.0 Fluorometer (ThermoFisher, Sg) con el kit Qubit 1x ds DNA HS Assay (ThermoFisher, Oregon, USA).
- Se generaron bibliotecas genómicas de las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA utilizando los siguientes primers:  
(F: 5'- CGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGC WGCAG-3' y R: 5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTA CHVGGGTATCTAATCC-3')
  - Los amplicones de las regiones V3 y V4 se generaron mediante reacciones de PCR y fueron purificados.
  - Se verificó el tamaño del amplicón por electroforesis capilar en el QIAxcelAdvanced System (Qiagen, Hilden, GA) con el QIAxcel DNA High resolution kit (Qiagen), el tamaño aproximado fue de 550pb.
  - Se indexaron las muestras usando los adaptadores con el kit Nextera XT Index (Qiagen, GmbH, GA) (v.2, Set A).
  - El producto se purificó y verificó mediante el uso de perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, USA).
  - La librería final se mezcló de manera equimolar y se secuenció en la plataforma MiSeq (Illumina CA, USA) con el kit MiSeq Reagent Kit V.3, 600 cycles (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante, generando lecturas de 300 bases en cada dirección.

## 5. ANÁLISIS:

El análisis estadístico se realizó en el Programa SPSS versión 15.0 (StataCorp, College Station, TX, USA) y se aplicó Q de Cochran y Chi cuadrada para evaluar descolonización en los dos grupos de estudio.

Los datos de secuenciación obtenidos se analizaron en el programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME v.1.9). Las lecturas fueron asignadas a nivel de phylum, clase, orden, familia, género y especie usando la comparación de las Operational Taxonomic Unit (OTUs) con QIIME contra la base de datos Greengenes (3.0). Con base a la cantidad de OTUs, se calcularon matrices de abundancia para cada nivel taxonómico (Phylum, Clase, Orden, Familia, Género, Especie), beta

diversidad, índice de Shannon y análisis de componentes para todos los grupos de estudio.

#### **6. ASPECTOS ÉTICOS:**

El trabajo de investigación fue previamente evaluado y aprobado por el Comité de Ética del INCMNSZ con número de registro 2459, llevado a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki, además se obtuvo un consentimiento informado de cada uno de los participantes.

## **CAPITULO V**

### **7. RESULTADOS**

#### **7.1 Estandarización del proceso de liofilización de las heces**

Las condiciones de liofilización determinadas fueron: 72 horas a  $-52^{\circ}\text{C}$  con una presión de 0.2 mbar para un volumen de 200mL de heces.

#### **7.2 Determinación de viabilidad de membrana**

El número de bacterias viables por cápsula fue de  $7 \times 10^{11}$  UFC/mL

#### **7.3 Estandarización de las cápsulas**

Las cápsulas que fueron aprobadas para el llenado con materia fecal liofilizada fueron las Vcaps ya que liberaron el contenido a  $\text{pH}=1$  (similar al del estómago) después de 20 horas y en el  $\text{pH} = 8$  (similar al del intestino) el contenido de la cápsula fue liberado en 1 hora 50 minutos, además el color y opacidad fueron los adecuados por cuestiones de estética, dado que al momento de administración a los pacientes es mejor que no se observe el contenido.

#### **7.4 Encapsulado de las heces liofilizadas**

El donador universal proporcionó un total de 350 gramos de heces con los cuales se encapsularon 1750 cápsulas con un contenido de 300mg cada una.

#### **7.5 Almacenamiento de las cápsulas con microbiota fecal liofilizada**

La temperatura para el almacenamiento de las cápsulas fue a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A esta temperatura la materia fecal liofilizada presentó menor humedad, comparada con las otras temperaturas de almacenamiento probadas a  $4^{\circ}\text{C}$  y  $18^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente del laboratorio).

#### **7.6 Selección del donador universal**

Se evaluaron un total de 85 candidatos a donador universal, de los cuales seis cumplieron con los criterios de selección, dos fueron seleccionados y solamente fue seleccionada una mujer de 27 años, estatura 1.63m, peso 59kg y un IMC de 22.21. Después de la entrevista y cuestionario aplicado al donador universal se realizó el tamizaje en heces y en sangre. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Resultados del tamizaje en heces y sangre realizado al donador universal previo obtención de microbiota fecal**

	<b>Prueba realizada</b>	<b>Resultado</b>
<b>Screening en heces para búsqueda de patógenos</b>	EVR	Negativo
	ERC	Negativo
	EBLEEs	Negativo
	GDH	Negativo
	Film array	Negativo
<b>Screening en sangre</b>	VHA, VHB, VHC	No Reactivo
	VIH	No Reactivo
	VDRL	No Reactivo
	Epstein-Barr	No Reactivo
	Química sanguínea: Glucosa,	Dentro de VR <sup>a</sup>
	Urea, Creatinina	Dentro de VR
	Perfil Lipídico: Colesterol,	Dentro de VR
	Triglicéridos, HDL, VLDL, LDL	
	Perfil hepático: AST, ALT,	Dentro de VR
	Bilirrubina total, directa e	
	indirecta, Proteínas totales,	
	Albúmina, Globulina, Fosfatasa	Dentro de VR
alcalina		
Hemoglobina glucosilada	Dentro de VR	
Biometría hemática	Dentro de VR	

a: Valor Referencial

### **7.7 Población de pacientes seleccionados para trasplante de microbiota fecal**

Se incluyeron 32 pacientes entre 18 y 70 años como candidatos para el TMF de marzo de 2019 a marzo de 2020, de los cuales 6 fueron excluidos por no presentar colonización por bacterias multirresistentes y/o *C. difficile* y 3 se perdieron en el seguimiento, quedando una población de 23 pacientes.

### **7.8 Análisis de los cambios en descolonización posterior a la administración del trasplante en los grupos de estudio**

Analizamos la prueba de GDH en todos los grupos tanto en la etapa inicial (basal) como a los 14 días posteriores (post TMF). El 50% (3/6) de los pacientes del Grupo 1 resultó negativo después de recibir 4 cápsulas de microbiota mientras que el 16.7% (1/6) se mantuvo positivo. En el caso del grupo 2 no hubo ningún cambio en el

resultado y en el grupo 3 no se pudo analizar ya que ningún paciente tuvo una prueba positiva basal. Sin embargo en el grupo 4 se observó que el 60% (3/5) con prueba basal negativa se convirtieron a prueba positiva después de la administración de las 4 cápsulas de placebo y el 20% (1/5) se mantuvo positivo. Tabla 4.

**Tabla 4. Resultados obtenidos de la prueba GDH de *C. difficile*, basal y post-trasplante en los grupos de pacientes del estudio.**

Tratamiento	Basal	Post Trasplante		Total
		N = 23		
		Negativo (%)	Positivo (%)	n (%)
Grupo 1 4 cápsulas de Microbiota	<b>Negativo</b>	2(33.3)	0	2(33.3)
	<b>Positivo</b>	3(50)	1(16.7)	4(66.7)
	<b>Total</b>	5(83.3)	1(16.7)	6(100)
Grupo 2 4 cápsulas de Placebo	<b>Negativo</b>	4(66.7)	0	4(66.7)
	<b>Positivo</b>	1(16.7)	1(16.7)	2(33.3)
	<b>Total</b>	5(83.3)	1(16.7)	6(100)
Grupo 3 8 cápsulas de Microbiota	<b>Negativo</b>	6(100)	0	6(100)
	<b>Positivo</b>	0	0	0
	<b>Total</b>	6(100)	0	6(100)
Grupo 4 8 cápsulas de Placebo	<b>Negativo</b>	1(20)	3(60)	4(80)
	<b>Positivo</b>	0	1(20)	1(20)
	<b>Total</b>	1(20)	4(80)	5(100)

Se buscaron toxinas por medio de la prueba Film array en las dos muestras (basal y post TMF) en los 4 grupos de estudio. Se observó que los grupos 1, 2 y 3 presentaron resultados similares a los resultados de la prueba GDH inicial. En el grupo 4 el

20%(1/5) se colonizó con una cepa toxigénica, mientras que el 20% (1/5) presentó una prueba negativa después del tratamiento con placebo. Tabla 5.

**Tabla 5. Resultados de las toxinas de *C. difficile* por medio del panel Film Array antes y después del trasplante en los grupos de pacientes que recibieron TFM o placebo.**

Tratamiento	Basal	Post trasplante N= 23		Total n (%)
		Negativo (%)	Positivo (%)	
Grupo 1 4 cápsulas de microbiota	<b>Negativo</b>	2(33.3)	0	2(33.3)
	<b>Positivo</b>	3(50)	1(16.7)	4(66.7)
	<b>Total</b>	5(83.3)	1(16.7)	6(100)
Grupo 2 4 cápsulas de Placebo	<b>Negativo</b>	4(66.7)	0	4(66.7)
	<b>Positivo</b>	2(33.3)	0	2(33.3)
	<b>Total</b>	6(100)	0	6(100)
Grupo 3 8 cápsulas de Microbiota	<b>Negativo</b>	6(100)	0	6(100)
	<b>Positivo</b>	0	0	0
	<b>Total</b>	6(100)	0	6(100)
Grupo 4 8 cápsulas de Placebo	<b>Negativo</b>	3(60)	1(20)	4(80)
	<b>Positivo</b>	1(20)	0	1(20)
	<b>Total</b>	4(80)	1(20)	5(100)

En la Tabla 6 se observa que la descolonización de bacterias multirresistentes se presentó en los grupos 1 y 3 con un 66.7% y 33.3% respectivamente, siendo más eficiente el TFM en el grupo que recibió 4 cápsulas de microbiota con un 100% de descolonización. En el caso de los grupos 2 y 4 de Placebo no se observó ningún

cambio después recibir del TMF, manteniéndose colonizados en un 100% en donde se observó significancia estadística ( $p < 0,001$ ). Tabla 6.

**Tabla 6. Resultados de la evaluación de descolonización de bacterias multirresistentes mediante cultivo en los grupos de pacientes del estudio.**

Tratamiento	Post <sup>a</sup>		Total n(22) <sup>b</sup>
	Colonizado (%)	Descolonizado (%)	n (%)
<b>Grupo 1</b>			
<b>4 cápsulas de Microbiota</b>	5	5 (66.7)	5(22.7)
<b>Grupo 2</b>			
<b>4 cápsulas de Placebo</b>	6 (42.9)	0	6(26.1)
<b>Grupo 3</b>			
<b>8 cápsulas de Microbiota</b>	3(21.4)	3(33.3)	6(26.1)
<b>Grupo 4</b>			
<b>8 cápsulas de Placebo</b>	5(35.7)	0	5(21.7)
<b>Total</b>	14(100)	8(100)	22(100)

P < 0.001 prueba  $\chi^2$

a: Solo se evalúa a los 14 días posterior a la administración de cápsulas ya que en condiciones basales todos presentaban colonización por bacterias multirresistentes

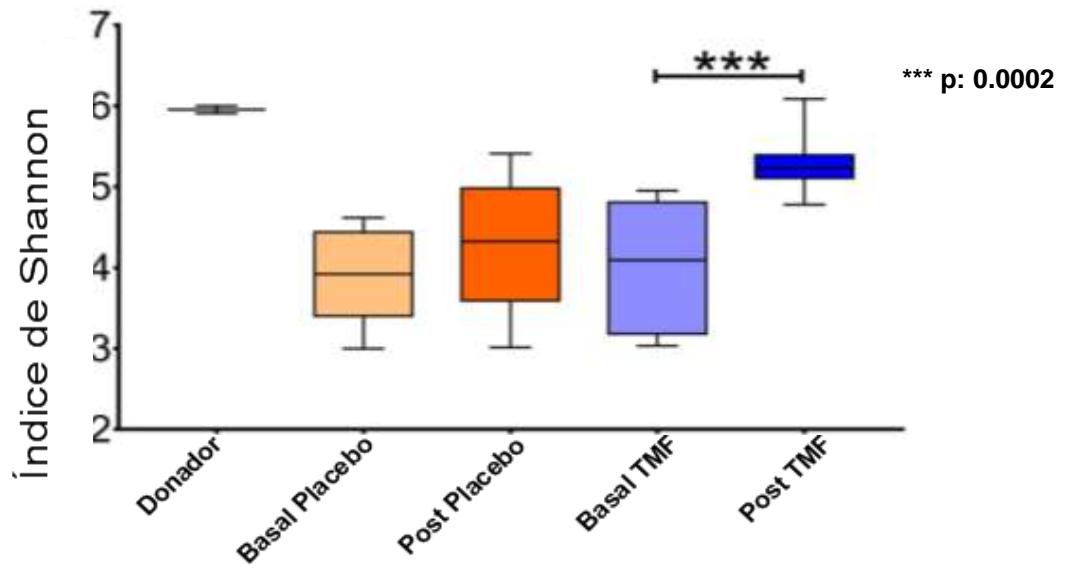
b: Se analizaron los resultados de 22 pacientes, uno no presentó colonización por bacterias multirresistentes en condiciones basales

### 7.9 Análisis de cambios en el perfil de la microbiota: basal y post TMF

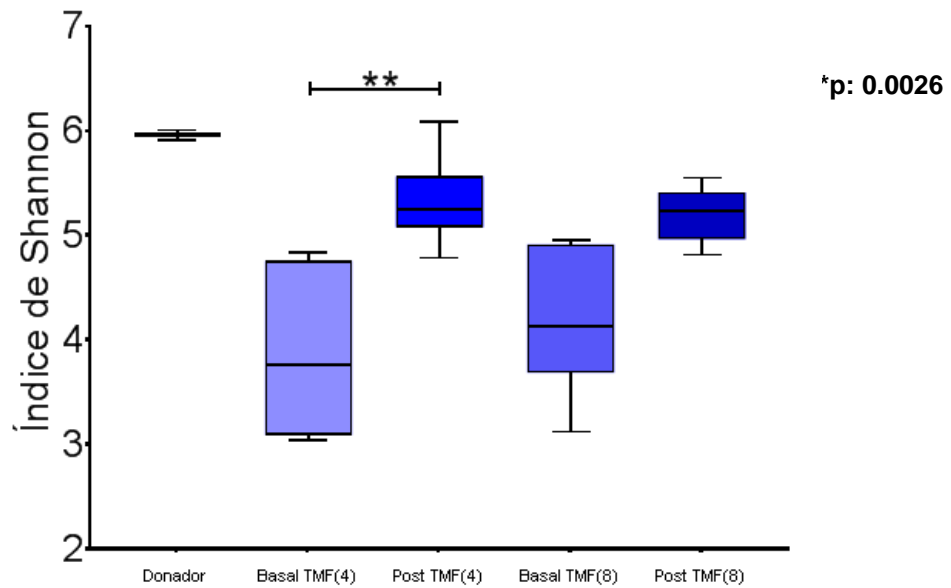
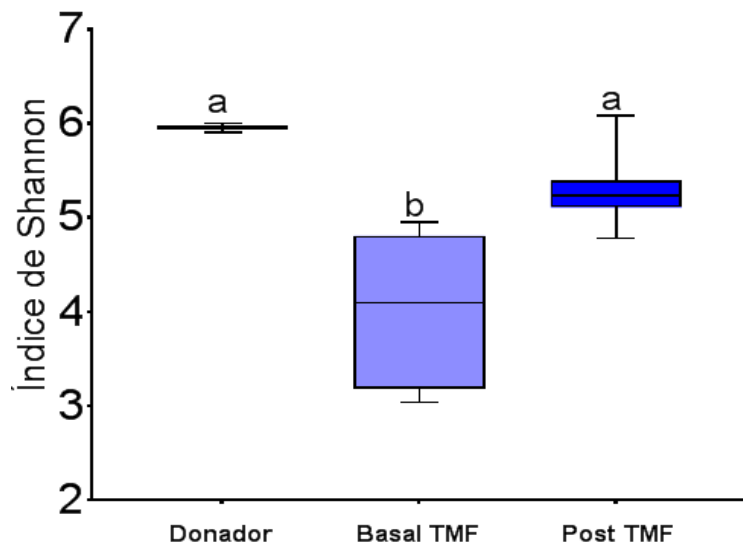
En la figura 9 se puede observar que la alpha diversidad evaluada por el índice de Shannon A) en el grupo del donador universal obtuvo el valor más alto de todos los grupos estudiados con un valor de 5.98 mientras que los grupos de placebo y microbiota antes del trasplante presentaron un índice cercano a 4. Solo el grupo que recibió el TMF presentó un aumento en la diversidad microbiana, mientras el grupo que recibió placebo no presentó cambios en la diversidad. El panel B) muestra que el índice de Shannon del grupo que recibió microbiota aumentó significativamente de 3.76 a 5.24 en el grupo que recibió 4 cápsulas comparado con el de 8 cápsulas. El panel C) muestra que el índice de Shannon en el grupo placebo permanece constante sin cambios importantes en la diversidad microbiana.



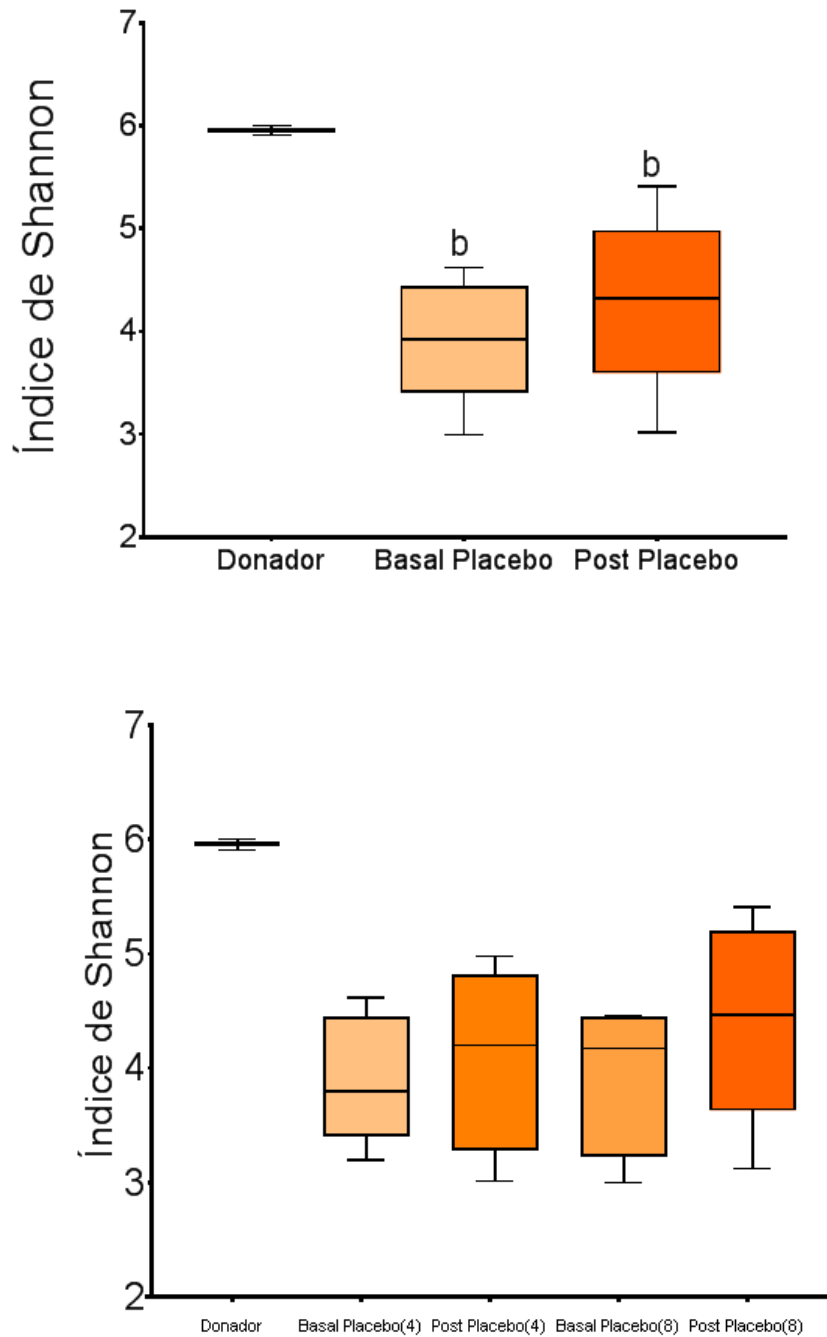
A)



B)



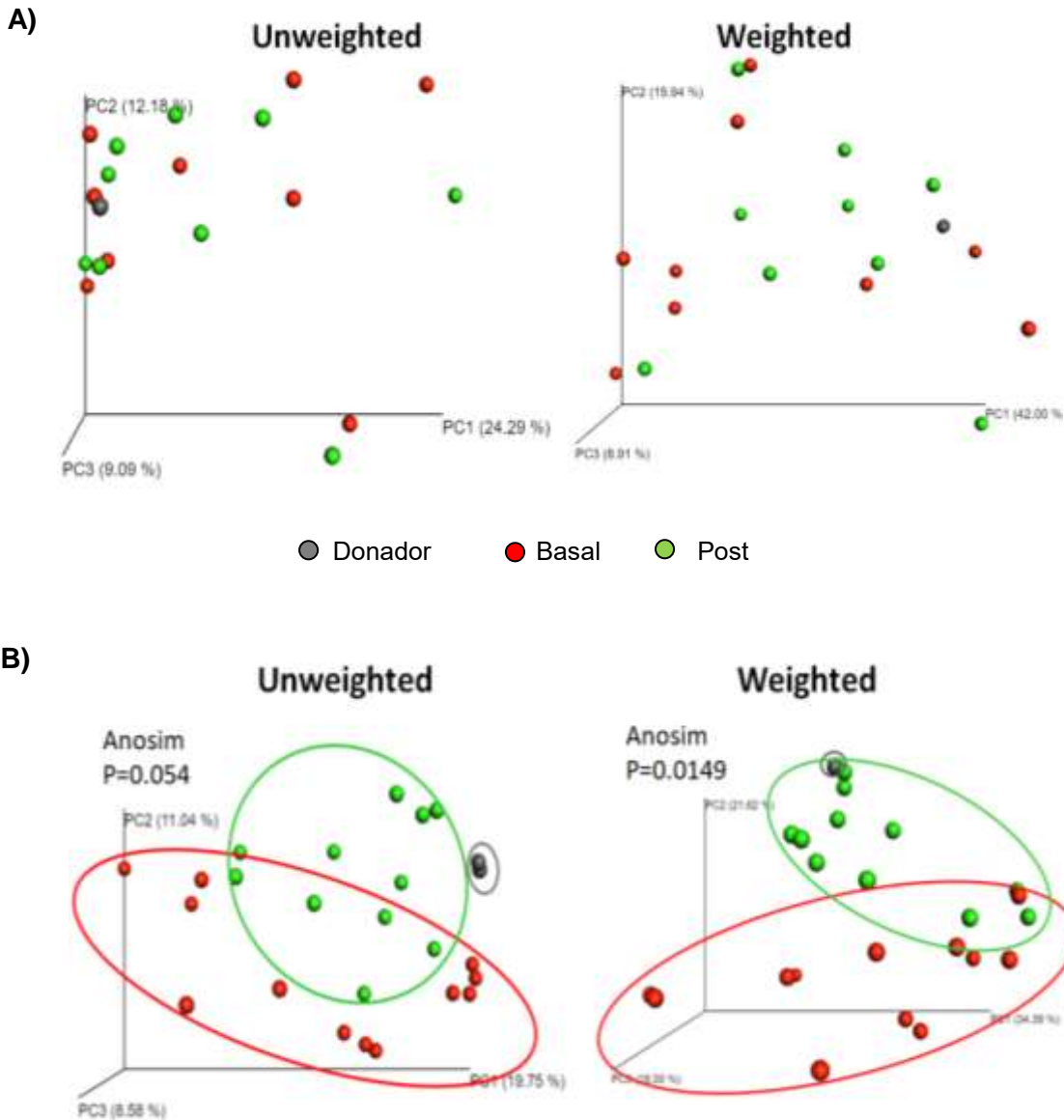
c)



**Figura 9.** A) Índice de Shannon para alpha diversidad en el donador universal y grupos de estudio Basal y Post B) índice de Shannon de donador universal y grupos que recibieron TMF C) Índice de Shannon del donador universal y grupos que recibieron placebo. Los números (4) y (8) hacen referencia al número de cápsulas que recibieron.

En la Figura 10 se muestra el análisis de componentes principales indicando las similitudes o disimilitudes de comunidades bacterianas entre A) el donador y los pacientes que recibieron placebo indicando que la microbiota de los pacientes fue

similar antes y después de la administración de placebo. Sin embargo, en el panel B) se observa que la microbiota fecal basal de los pacientes es diferente a la del donador pero posterior a la administración de microbiota las distancias Unifrac disminuyen, y la microbiota es similar a la del donador. El análisis de similitud unweighted (No ponderado) muestra un p de 0.054 y para weighted (ponderado) muestra una p de 0.0149.



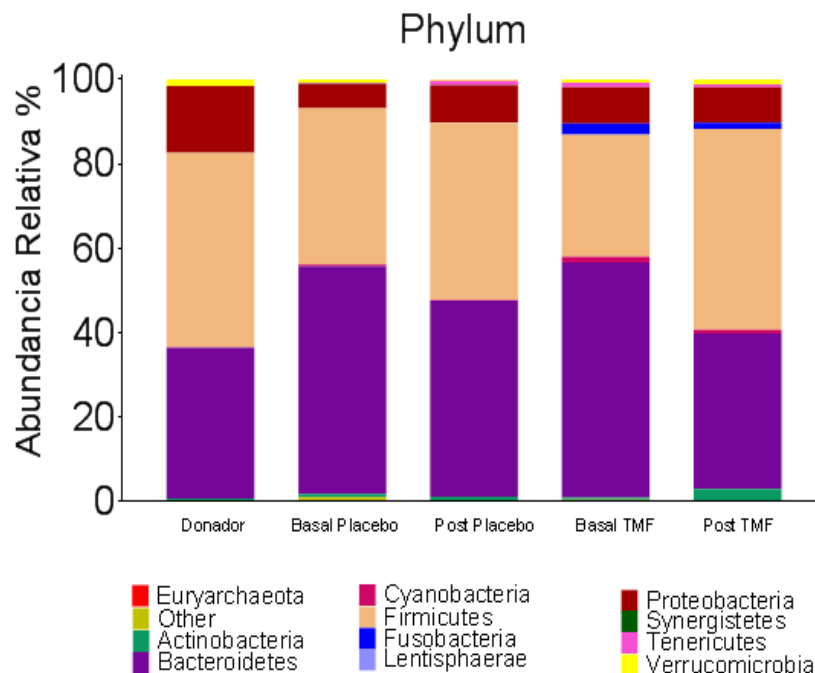
**Figura 10. Análisis de Coordenadas Principales para Beta diversidad (PcoA) basada en distancias Unifrac:** A) Donador universal y Grupo Placebo, B) Donador universal y Grupo microbiota. Los círculos rojos indican la microbiota de los pacientes antes de la intervención y los círculos verdes indican la microbiota de los pacientes después de la intervención

En la tabla 7 y figura 11 se observa que la abundancia relativa a nivel de phylum del donador universal mostró un mayor porcentaje de *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*, menor porcentaje de *Bacteroidetes* y *Cyanobacteria* y no hubo presencia del phylum *Fusobacteria* y de *Tenericutes* comparada con los grupos de estudio. Con respecto a los pacientes que recibieron TMF se observó incremento del phylum *Firmicutes* y *Verrucomicrobia*, se observó disminución de *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria* y *Tenericutes*, con porcentajes similares a la abundancia relativa del donador universal.

Por otro lado, en los pacientes que recibieron placebo se observó ligero incremento del phylum *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Tenericutes* posterior a la intervención, así como la disminución de *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* y *Cyanobacteria*, no se observó el phylum *Fusobacteria*. Tabla 7-Fig11.

**Tabla 7. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Phylum en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.**

Phylum	Donador Universal (%)	Pacientes Basal TMF (%)	Pacientes Post TMF (%)	Pacientes Basal Placebo (%)	Pacientes Post Placebo (%)
<i>Firmicutes</i>	46.0	29.0	47.51	37.0	42.0
<i>Bacteroidetes</i>	35.75	55.64	36.82	53.95	46.44
<i>Proteobacteria</i>	15.81	8.60	8.32	5.74	8.77
<i>Verrucomicrobia</i>	1.75	0.79	1.15	0.75	0.31
<i>Actinobacteria</i>	0.73	0.47	2.57	0.71	0.94
<i>Fusobacteria</i>	0	2.59	1.47	0	0
<i>Cyanobacteria</i>	0	1.40	0.94	0.41	0.14
<i>Tenericutes</i>	0	1.05	0.73	0.23	1.03



**Figura 11. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Phylum en el donador universal y los grupos de estudio.**

A nivel de clase, *Clostridia* y *Bacteroidia* fueron las más representativas en el donador universal, también se observó *Verrucomicrobia*, *Betaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*. Otras clases se observaron también en el perfil del donador universal pero en menor porcentaje como se muestra en la tabla 8.

En los pacientes que recibieron TMF se observó incremento de *Clostridia*, *Verrucomicrobiae*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Erysipelotrichi*, así como la disminución de las clases *Bacteroidia* y *Gammaproteobacteria*. *Bacilli* se mantuvo con porcentaje constante y a diferencia del donador universal y en el grupo placebo si se observó la clase *Fusobacteria*.

En los pacientes que recibieron placebo se observó ligero incremento de las clases *Clostridia*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* y *Actinobacteria*, además la disminución de *Bacteroidia*, *Verrucomicrobiae*, *Betaproteobacteria* y *Erysipelotrichi*. Al igual que en el donador universal, no se observó la clase *Fusobacteria*. Tabla8- Fig12.

Tabla 8. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Clase en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.

Clase	Donador Universal (%)	Pacientes Basal TMF (%)	Pacientes Post TMF (%)	Pacientes Basal Placebo (%)	Pacientes Post Placebo (%)
<i>Clostridia</i>	46.27	24.18	41.97	29.62	36.32
<i>Bacteroidia</i>	36.0	55.44	37.0	54.4	46.47
<i>Verrucomicrobiae</i>	7.9	1.0	3.4	3.34	1.89
<i>Betaproteobacteria</i>	5.23	1.19	3.14	1.26	0.90
<i>Alphaproteobacteria</i>	2.47	0.14	0.98	0.92	1.65
<i>Gammaproteobacteria</i>	0.6	7.9	1.83	3.30	5.67
<i>Bacilli</i>	0.09	2.12	2.2	2.50	3.38
<i>Actinobacteria</i>	0.43	0.37	2.29	0.33	0.61
<i>Erysipelotrichi</i>	0.04	2.11	3.52	2.75	0.92
<i>Fusobacteria</i>	0	2.48	1.49	0	0

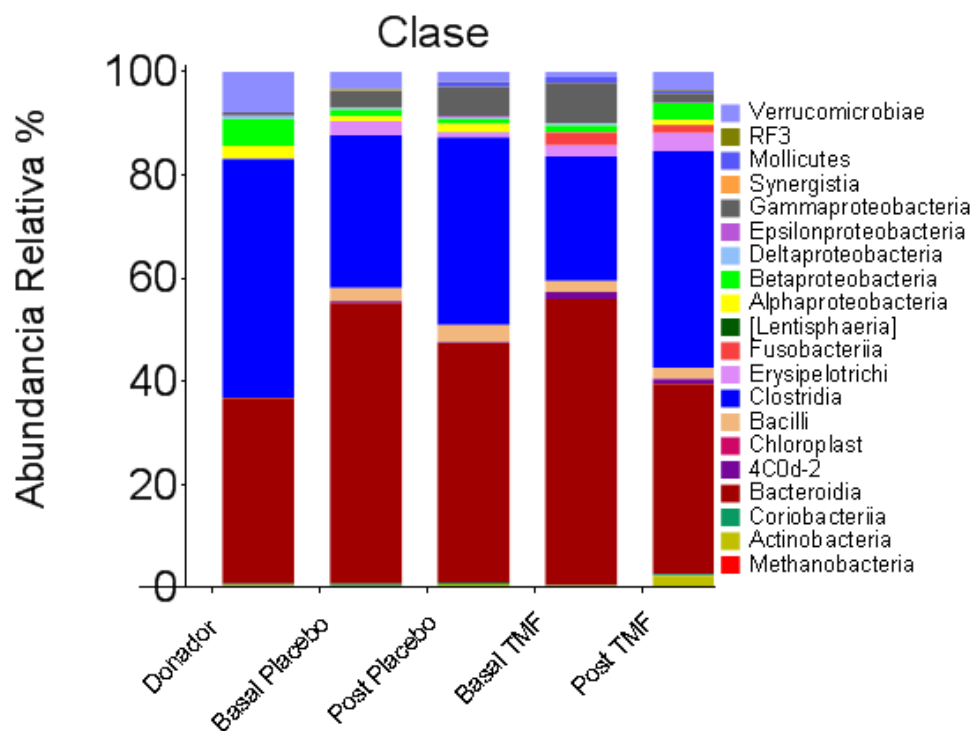


Figura 12. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Clase del donador universal y los grupos de estudio

A nivel de orden se observó en el donador universal y en los grupos de estudio, los cambios en la abundancia relativa de *Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Verrucomicrobiales* y *Fusobacteriales* que fue similar a la mencionada a nivel de clase. El orden

*Burkholderiales* presentó mayor porcentaje en el donador a diferencia de los grupos de estudio, así como un porcentaje mínimo de *Enterobacteriales* y *Bifidobacteriales*.

En los pacientes que recibieron TMF se observó ligero incremento de *Burkholderiales* y *Bifidobacteriales* mientras que el porcentaje para *Lactobacillales* se mantuvo constante. También se presentó disminución significativa de *Enterobacteriales* y en menor porcentaje *Erysipelotrichales*.

Por otro lado, en la abundancia relativa de los pacientes que recibieron placebo se observó incremento de *Enterobacteriales* y *Lactobacillales* mientras que el porcentaje de *Bifidobacteriales* fue semejante antes y después de la intervención, sin embargo se observó ligera disminución de *Erysipelotrichales* y *Burkholderiales*. Tabla9- Fig 13.

**Tabla 9. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Orden en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.**

Orden	Donador Universal (%)	Pacientes Basal TMF (%)	Pacientes Post TMF (%)	Pacientes Basal Placebo (%)	Pacientes Post Placebo (%)
<i>Clostridiales</i>	46.26	24.18	40.43	29.61	36.29
<i>Bacteroidales</i>	36	55.44	36.95	54.4	46.47
<i>Verrucomicrobiales</i>	7.87	0.94	6.07	0.67	0.55
<i>Burkholderiales</i>	5.22	1.19	2.97	1.26	0.90
<i>Enterobacteriales</i>	0.46	7.88	2.66	3.25	5.65
<i>Bifidobacteriales</i>	0.43	0.35	2.28	0.32	0.57
<i>Lactobacillales</i>	0.09	2.12	2.16	2.50	3.37
<i>Erysipelotrichales</i>	0.04	2.11	1.70	2.75	0.92
<i>Fusobacteriales</i>	0	2.48	1.49	0	0

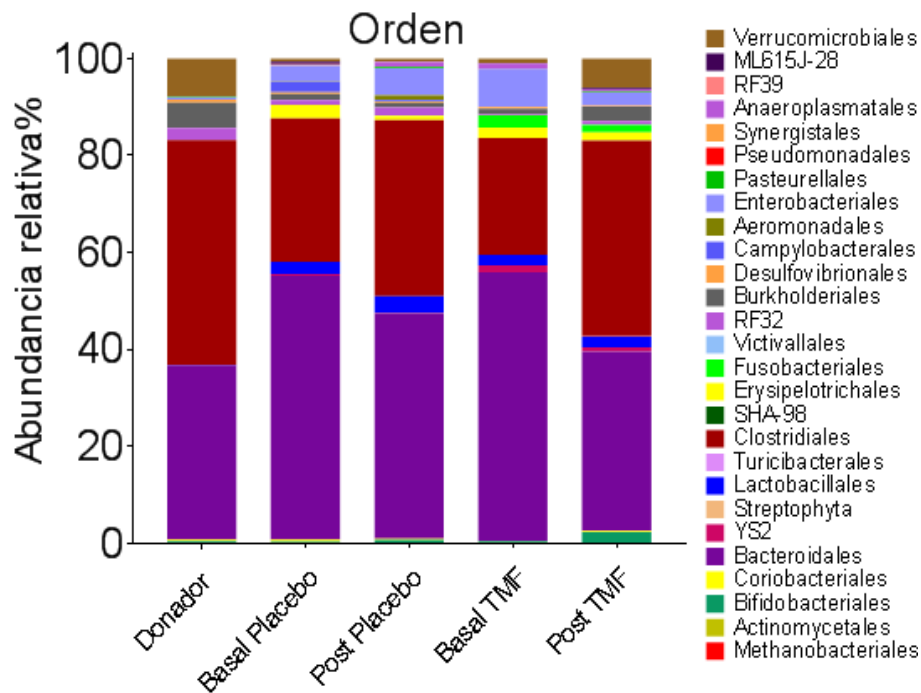


Figura 13. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Orden del donador universal y los grupos de estudio

A nivel de familia, se observó en el donador universal mayor abundancia relativa de *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, seguido de las familias *Verrucomicrobiaceae*, *Ricaenellaceae*, *Alcaligenaceae*, *Veillonellaceae*, *Porphyromonadaceae* y *Barnesiellaceae*. En un porcentaje mínimo se observó *Enterobacteriaceae* y *Bifidobacteriaceae*.

La abundancia relativa para los pacientes que recibieron TMF reflejó incremento de las familias con mayor abundancia relativa en el perfil del donador obteniendo porcentajes similares, mientras que *Ricaenellaceae*, *Alcaligenaceae*, *Barnesiellaceae* y *Enterococcaceae* se mantuvieron constantes antes y después del TMF. Además se observó disminución de *Bacteroidaceae*, *Veillonellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Prevotellaceae* y *Erysipelotrichaceae*.

En los pacientes que recibieron placebo se observó incremento de las familias *Ruminococcaceae*, *Ricaenellaceae*, *Enterobacteriaceae*. También se observó disminución en *Bacteroidaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Porphyromonadaceae* y en mejor porcentaje *Alcaligenaceae*, *Veillonellaceae*, *Prevotellaceae* y *Erysipelotrichaceae*. Tabla10-Fig14.



Tabla 10. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Familia en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.

Familia	Donador Universal (%)	Pacientes Basal TMF (%)	Pacientes Post TMF (%)	Pacientes Basal Placebo (%)	Pacientes Post Placebo (%)
<i>Bacteroidaceae</i>	33.3	30.74	24.02	35.55	30.52
<i>Lachnospiraceae</i>	23.02	8.94	20.96	13.09	13.68
<i>Ruminococcaceae</i>	21.02	9.02	15.15	11.31	17.47
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	8.0	0.8	6.6	3.43	0.57
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.52	8.0	3.0	3.35	5.92
<i>Prevotellaceae</i>	0	16.59	10.74	10.96	8.79
<i>Veillonellaceae</i>	1.30	5.64	3.83	3.38	2.07
<i>Porphyromonadaceae</i>	1.14	5.76	0.87	6.16	1.85
<i>Alcaligenaceae</i>	2.91	1.23	1.34	1.36	0.90
<i>Barnesiellaceae</i>	1.13	0.13	0.70	0.70	1.45
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0.48	0.42	2.33	0.38	0.59
<i>Ricaenellaceae</i>	3.88	1.01	1.12	1.99	4.97
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0	2.38	1.23	2.86	0.98
<i>Enterococcaceae</i>	0	1.29	1.25	1.12	1.86

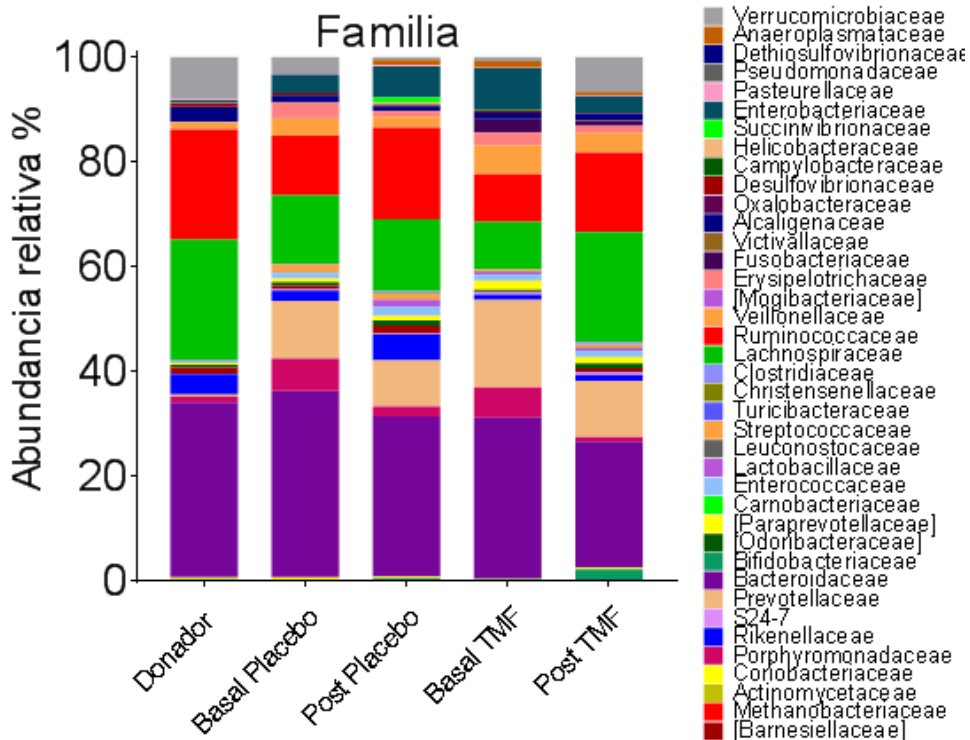


Figura 14. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Familia en el donador universal y los grupos de estudio

A nivel de género el donador universal presentó mayor abundancia relativa de *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Roseburia*, *Akkermansia* y *Sutterella*, seguido de los géneros *Ruminococcus*, *Prevotella* y *Blautia*. En menor porcentaje se observó *Coprococcus*, *Parabacteroides*, *Lachnospira*, *Bifidobacterium*, el género *Escherichia* presentó un mínimo porcentaje.

Para los pacientes que recibieron TMF se observó incremento de la mayoría de géneros como *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Roseburia*, *Akkermansia*, *Suterella*, *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Bifidobacterium*, algunos géneros que presentaron porcentaje relativo mínimo se mantuvieron similares antes y después de la intervención. Además se observó la disminución de *Prevotella* y *Escherichia*.

Por otro lado en la abundancia relativa de los pacientes que recibieron placebo se observó ligero incremento de *Faecalibacterium* y *Oscillospira*. Además se observó disminución de *Bacteroides*, *Akkermansia*, *Sutterella*, *Parabacteroides*. Tabla11-Fig15.

**Tabla 11. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Género en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.**

Género	Donador Universal (%)	Pacientes Basal TMF (%)	Pacientes Post TMF (%)	Pacientes Basal Placebo (%)	Pacientes Post Placebo (%)
<i>Bacteroides</i>	26.52	34.51	23.73	40.43	34.72
<i>Faecalibacterium</i>	13.9	4.40	10.7	5.49	9.83
<i>Akkermansia</i>	8.41	2.52	7.26	1.77	0.87
<i>Ruminococcus</i>	5.90	0.76	3.41	2.14	3.77
<i>Roseburia</i>	10.18	2.32	6.19	1.74	2.29
<i>Sutterella</i>	7.32	1.50	6.0	1.64	1.0
<i>Oscillospira</i>	12.66	0.84	3.37	2.06	3.15
<i>Escherichia</i>	0.57	6.83	0.76	3.39	3.65
<i>Prevotella</i>	5.27	19.65	11.86	12.28	10.56
<i>Blautia</i>	4.12	0.18	0.52	0.34	0.92
<i>Coprococcus</i>	2.75	0.37	1.0	0.73	0.91
<i>Parabacteroides</i>	1.29	6.44	1.0	7.11	2.0
<i>Lachnospira</i>	1.28	2.32	4.08	1.96	1.48
<i>Bifidobacterium</i>	0.60	0.49	2.77	0.44	0.71
<i>Veillonela</i>	0	2.74	2.76	0.87	0.58
<i>Enterococcus</i>	0	1.52	2.66	1.31	2.05
<i>Lactobacillus</i>	0	0.29	0.38	0	1.26
<i>Clostridium</i>	0	0.22	0.40	1.51	3.61
<i>Klebsiella</i>	0	0.15	0.59	0.16	0.95

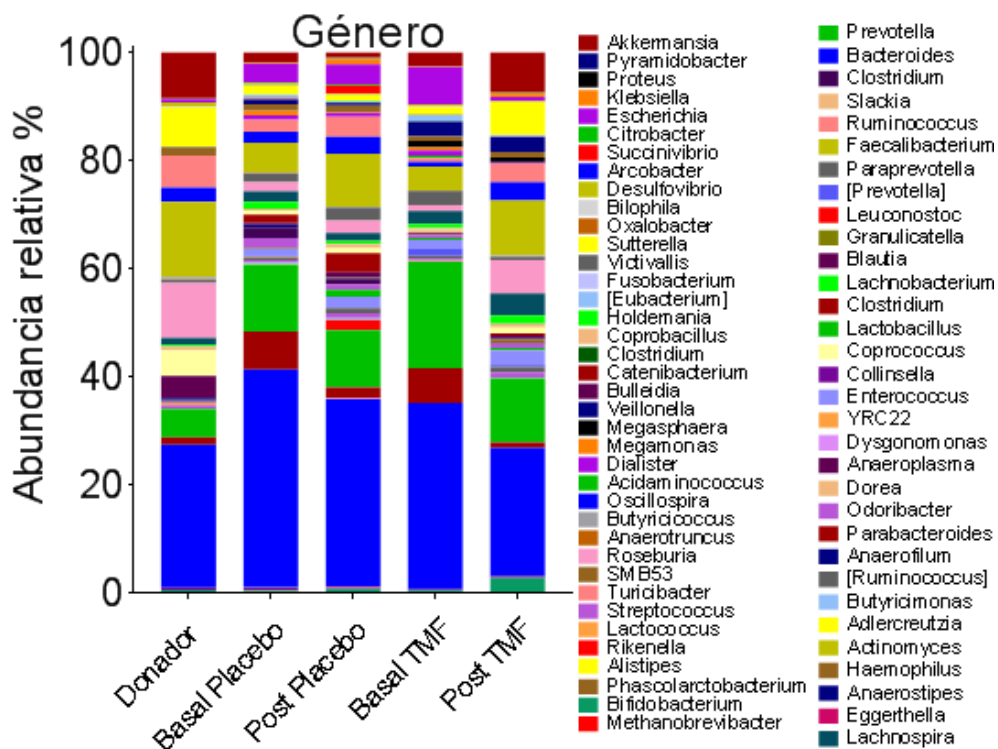


Figura 15. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Género para donador universal y grupos de estudio

A nivel de especie se observó que *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides coprophilus* y *Blautia obeum* estaban presentes solamente en el perfil del donador universal, otras especies como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* y *Prevotella copri* presentaron mayor abundancia relativa, en menor porcentaje *Roseburia faecis*, *Bacteroides uniformis*, *Ruminococcus callidus*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides eggerthii*, otras especies como *Escherichia coli*, *Ruminococcus gnavus*, presentaron un porcentaje menor al 1%. En los pacientes que recibieron TMF se observó incremento de *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Roseburia faecis*, además la aparición de especies que estaban presentes solo en el perfil del donador como *Ruminococcus callidus*, *Bacteroides eggerthii* y *Bifidobacterium longum*. También se observó la disminución de *Prevotella copri* y *Escherichia coli*.

Finalmente en los pacientes que recibieron placebo se observó el incremento de *Bacteroides uniformis* y *Escherichia coli*, mientras que especies como *Akkermansia muciniphila*, *Prevotella copri*, *Bacteroides plebeius*, *Parabacteroides distasonis* y *Bacteroides fragilis* disminuyeron. Tabla12- Fig16.

Tabla 12. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Especie en el donador universal y los grupos de estudio antes y después de la intervención.

Especie	Donador Universal (%)	Pacientes Basal TMF (%)	Pacientes Post TMF (%)	Pacientes Basal Placebo (%)	Pacientes Post Placebo (%)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	25.47	9.25	18	10	10
<i>Akkermancia muciniphila</i>	22.86	4.71	21.47	3.26	1.67
<i>Roseburia faecis</i>	4	0.85	6.90	0.96	1
<i>Escherichia coli</i>	1.0	13.96	2.10	5.31	7.31
<i>Prevotella copri</i>	19.54	27.38	10.19	20.54	15.54
<i>Ruminococcus bromii</i>	0.62	0.86	1.61	1.10	2.79
<i>Ruminococcus gnavus</i>	0.95	3.98	0.65	2.56	3.33
<i>Ruminococcus callidus</i>	2.10	0	0.52	0	0
<i>Bacteroides ovatus</i>	9.70	0	0	0	0
<i>Bacteroides coprophilus</i>	9.70	0	0	0	0
<i>Bacteroides uniformis</i>	3.63	3.96	1.83	6.87	10.25
<i>Bacteroides caccae</i>	1.81	1.56	1.66	2.48	2.93
<i>Bacteroides eggerthii</i>	1.67	0	2.20	0.39	2
<i>Bacteroides plebeius</i>	0.88	1.97	1.99	4.41	0.65
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	0.14	1.51	3.16	0.41
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.50	6	0.72	4.54	2
<i>Bifidobacterium longum</i>	0.81	0	2	0.70	0
<i>Blautia obeum</i>	1.15	0	0	0	0
<i>Veillonela dispar</i>	0	4.77	3.65	1.40	1.21

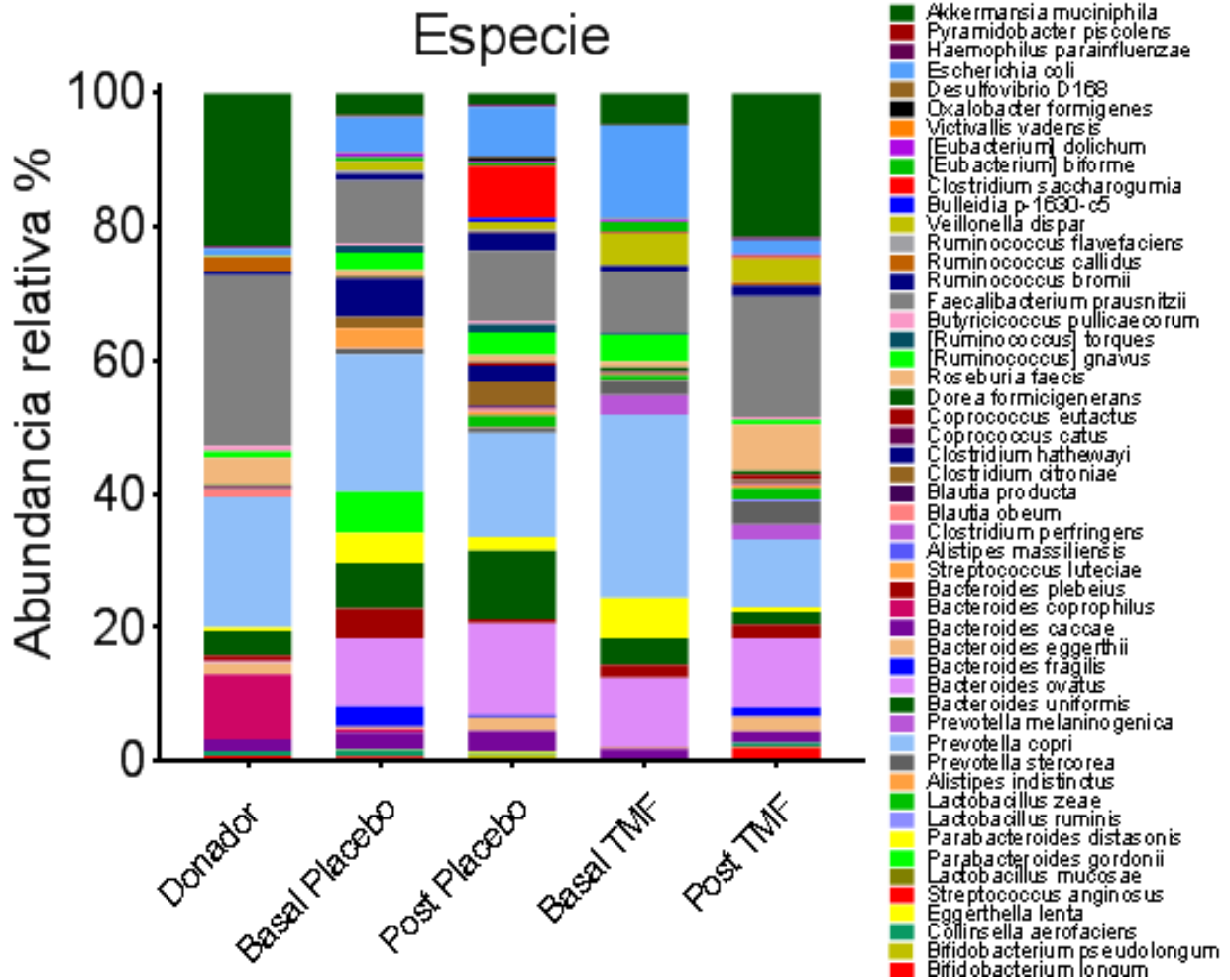


Figura 16. Resumen taxonómico de abundancia relativa a nivel de Especie para donador universal y grupos de estudio.

## CAPITULO VI

### 8. DISCUSIÓN

En este estudio describimos la estandarización y elaboración de microbiota fecal liofilizada y almacenada en cápsulas para TMF en pacientes colonizados por bacterias MDR y *C. difficile*, así como el análisis de la descolonización, perfil de microbiota intestinal del donador universal y de los grupos de estudio antes y después del TMF.

La estandarización incluyó el tratamiento previo de heces en condiciones similares a las reportadas por Hamilton M y cols., en 2012 en donde se describe la preparación de materia fecal congelada para trasplante de microbiota en pacientes con infección recurrente por *C. difficile*,<sup>(3)</sup> sin embargo el crioprotector utilizado por dichos autores fue el glicerol, en nuestro estudio se utilizó sal de trehalosa, la cual es más eficiente ya que evita la formación de cristales en la membrana celular de las bacterias en el momento de la congelación y al mismo tiempo permite que el proceso de liofilización sea más rápido.<sup>(4)</sup>

Con respecto a la liofilización se determinaron condiciones específicas de temperatura, presión y tiempo, así como la medición del inóculo y viabilidad de las bacterias en la muestra liofilizada. El estudio realizado por Staley y cols, también reportó liofilización y encapsulado de heces, sin embargo, las cápsulas utilizadas no fueron entéricas.<sup>(4)</sup> En la literatura ya se ha reportado la efectividad y seguridad de la administración de cápsulas con materia fecal congelada en la resolución de IRCD,<sup>(5)(46)</sup> pero en nuestro estudio nosotros utilizamos cápsulas entéricas que tienen la ventaja de ser resistentes a los ácidos gástricos y liberar su contenido en el íleon<sup>(73)</sup>, resultados que fueron confirmados cuando las probamos en condiciones ácidas y encontramos que se disuelven en 110 minutos después de haber sido ingeridas. La eficacia de la materia fecal liofilizada en nuestro estudio se vio reflejada en los resultados de descolonización y cambios en la microbiota intestinal coincidiendo con lo reportado por Tian y cols., sin embargo, en ese estudio no se determinó el inóculo de bacterias viables por cápsula, ni el número de cápsulas necesarias para la descolonización como en este estudio piloto, que encontramos que cuatro cápsulas son suficiente para la descolonización de bacterias MDR y *C. difficile*.<sup>(33)</sup>

Por otra parte Nielsen y cols., reportaron que la composición bacteriana de las heces almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  no se ve afectada, <sup>(70)</sup> pero en nuestro estudio se probaron diferentes temperaturas;  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $18^{\circ}\text{C}$ , y  $-80^{\circ}\text{C}$  y se estableció que la temperatura de almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  se conserva la estabilidad de la microbiota reflejada en los resultados de hidratación y conservación de la viabilidad bacteriana así como por la disponibilidad de ultra congeladores en la infraestructura de nuestro laboratorio.

Una vez que se concluyó la estandarización para la producción de cápsulas con microbiota fecal liofilizada, se realizó la selección de donadores universales tomando en cuenta las condiciones establecidas en el Consenso Europeo para TMF en la práctica clínica, así como las recomendaciones establecidas por la FDA en 2019. <sup>(60)</sup> <sup>(71)</sup> Para seleccionar los donadores universales, se evaluaron 85 candidatos de los cuales el 98% presentó colonización por bacterias resistentes a antibióticos, por ello, solo tuvimos un donador que participó en este estudio. Es importante remarcar que la búsqueda de un donador para TMF requiere de tiempo, infraestructura y disponibilidad de personal, <sup>(3)</sup> además la creciente prevalencia de MDR en la comunidad limita aún más el encontrar al candidato ideal. <sup>(71)</sup>

Se ha reportado que el TMF representa una alternativa terapéutica efectiva para la ICD, es por eso que la mayoría de estudios han sido enfocados para la evaluación de su resolución clínica, <sup>(5)</sup> <sup>(12)</sup> <sup>(31)</sup> sin embargo, este trabajo estuvo enfocado en la descolonización de *C. difficile* donde observamos que el 50% de los pacientes presentaron una prueba negativa para GDH y detección de las toxinas después de recibir cápsulas de microbiota, pero no encontramos diferencia estadísticamente significativa entre el grupo que recibió TMF contra el grupo que recibió placebo.. Estos resultados pueden atribuirse al número limitado de participantes que estuvieron colonizados por *C. difficile* en condiciones basales.

Así mismo, en los últimos años se ha observado una relación entre el impacto de los antibióticos en la microbiota y las infecciones multirresistentes causadas por bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal por lo que el uso del TMF para descolonización de organismos MDR se ha incrementado, <sup>(1)</sup> <sup>(34)</sup> <sup>(35)</sup> no obstante, estas investigaciones en su mayoría han sido reporte de casos, estudio en modelos animales o un hallazgo

secundario en el tratamiento por infección recurrente por *C. difficile* <sup>(35)</sup> como los estudios realizados por Dubberke y cols., quienes reportan 73% de descolonización por VRE posterior al TMF, el cual fue utilizado para la IRCD <sup>(57)</sup> o el de Millan y cols., el cual se enfocó en la evaluación de genes de resistencia posterior al TMF para pacientes con IRCD, obteniendo una disminución significativa de dichos genes. <sup>(37)</sup> Además se ha visto variación en el porcentaje de descolonización de bacterias MDR, como lo informado por Ramandeep y cols., quienes encontraron que solamente 20% de los pacientes se descolonizaron de *E. coli* productora de BLEE posterior al trasplante, <sup>(72)</sup> pero en una revisión sistemática se observó, que el rango de descolonización reportado fue de 37.5% a 87.5%. <sup>(61)</sup> En este estudio se observó que *E. coli* productora de BLEE fue la bacteria más frecuente (68.2%), también se aisló con menor frecuencia *Klebsiella* spp., productora de BLEE y resistentes a carbapenémicos, además *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. La descolonización se presentó en el 73% de los pacientes, siendo más efectiva en el grupo que recibió 4 cápsulas de microbiota con 100% de descolonización y de manera interesante los pacientes que recibieron placebo se mantuvieron colonizados por *E. coli* y *Klebsiella* spp., en el 100%. <sup>(71)</sup>

En cuanto al análisis de la microbiota intestinal, nuestros resultados muestran la alpha diversidad del donador por el índice de Shannon de 5.98, el cual indica gran heterogeneidad en el perfil de su microbiota. Un resultado importante fue que los pacientes que recibieron TMF presentaron incremento en la diversidad microbiana de 3.76 basal a 5.24 post TMF es decir, microbiota semejante al índice del donador, mientras que el índice de los pacientes que recibieron placebo permaneció semejante en el basal y en el post placebo. Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Youngster y cols., donde la diversidad post TMF fue comparable con la de sus donadores. <sup>(31)</sup> Otro punto significativo de este análisis fue que a pesar que el TMF reflejó un incremento similar a la diversidad del donador, no se observó diferencia significativa al momento de administrar 4 u 8 cápsulas, por lo que podemos estimar que 4 cápsulas es una dosis eficiente para el TMF.

Por otro lado, el análisis de componentes principales (PcoA) basado en los datos taxonómicos del donador y grupos de estudio demostró que la microbiota fecal de los



pacientes presentó disimilitud con la del donador. Stripling y cols., reportaron resultados similares en cuanto a la agrupación de la microbiota del donador y receptor; sin embargo no observaron similitud de la microbiota posterior al TMF. <sup>(56)</sup> En nuestro estudio se observó que 14 días posteriores a la administración del TMF las distancias Unifrac disminuyeron y la microbiota de los pacientes presentó similitud a la del donador. Un resultado sustancial de este análisis fue que la microbiota de los pacientes que recibieron placebo fue similar antes y después de la intervención.

Estudios previos sobre el análisis de abundancia relativa de microbiota intestinal han demostrado que una microbiota sana posee una composición diversa, así mismo se ha observado que ciertas familias de bacterias se encuentran principalmente en personas sanas. En este estudio, el análisis de abundancia relativa a nivel de phylum, el donador presentó menor porcentaje de Bacteroidetes y mayor cantidad de *Firmicutes* con respecto a los grupos de estudio, estos resultados son similares a los informados por Millan y cols. <sup>(37)</sup> A nivel del phylum *Proteobacteria*, nosotros observamos que no hubo diferencias importantes entre el donador y los grupos de estudio, sin embargo, observamos incremento de los phylum *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* y disminución del phylum *Fusobacteria* en los grupos que recibieron TMF.

A nivel de clase, en pacientes que recibieron TMF se observó incremento de *Verrumicrobiae*, aparición de *Alphaproteobacteria* y disminución de *Gammaproteobacteria*, lo que muestra abundancia relativa similar a la del donador. Estos cambios fueron más específicos en la agrupación taxonómica a nivel de orden que muestran un porcentaje mínimo de *Enterobacteriales* en el donador y disminución significativa en los grupos post TMF.

A nivel de familia en nuestro estudio se observó mayor abundancia relativa de las familias *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Verrucomicrobiaceae* en la microbiota del donador, ausencia de *Prevotellaceae* y *Enterococcaceae* y un porcentaje mínimo de la familia *Enterobacteriaceae* (0.52%). Un resultado importante en el grupo que recibió TMF fue la disminución significativa de la familia *Enterobacteriaceae* y el incremento de *Verrucomicrobiaceae*. En contraste con los pacientes del grupo basal y post placebo, quienes presentaron mayor abundancia relativa de *Prevotellaceae*, *Enterococcaceae* y *Enterobacteriaceae*. De manera similar

otros autores, informaron predominio de familias como *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* y *Bacteroidaceae* pero en personas sanas a diferencia de pacientes con infección por *C. difficile*, en quienes se observó menor diversidad en su composición microbiana e incremento de la familia *Enterobacteriaceae*.<sup>(58)(62)</sup>

De igual forma a nivel de género en el grupo post TMF, se observó incremento de *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Sutterella* y *Lachnospira* así como la disminución de *Parabacteroides* y *Escherichia*. Finalmente, a nivel de especie los cambios fueron más significativos en este mismo grupo de pacientes, los cuales se vieron reflejados en la mayor abundancia relativa de *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides eggerthii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia faecis* y *Akkermansia muciniphila*, mientras que especies como *Bacteroides uniformis*, *Parabacteroides distasonis*, *Veillonella dispar* y *Escherichia coli* disminuyeron.

La importancia de ciertas bacterias que forman parte de la microbiota en la salud y enfermedad, ha sido reportada en la literatura, así como los factores que influyen en la disbiosis de la misma. Nosotros encontramos resultados significativos en el grupo que recibió TMF como la disminución del phylum *Fusobacteria* el cual ha sido asociado con tumor colorrectal y la capacidad de activar respuestas inflamatorias,<sup>(63)</sup> *Proteobacteria* relacionado con enfermedad inflamatoria intestinal y estancia hospitalaria prolongada.<sup>(11)</sup> Además algunas especies que se observaron en el perfil del donador que han sido descritas como beneficiosas, estuvieron presentes 14 días después del TMF, entre ellas se encuentran *Faecalibacterium prausnitzii* y *Roseburia faecis*, los cuales se han asociado con la producción de ácidos grasos de cadena corta para suministrar energía en los enterocitos, metabolización de fibra dietética y propiedades antiinflamatorias; *Akkermansia muciniphila*, esta bacteria actúa con efectos protectores en enfermedades metabólicas, además de fortalecer la barrera intestinal mediante la producción de moco; algunas especies de *Bacteroides* participan en la excreción de moléculas inmunomoduladoras.<sup>(64)(65)</sup> Finalmente, debemos destacar la disminución de *E. coli* productora de BLEE en el grupo que recibió TMF, lo que pudimos observar tanto en el cultivo como en el análisis de la microbiota, este resultado es de gran importancia ya que esta bacteria fue aislada con mayor frecuencia en la muestra basal de los pacientes, sin embargo, es necesario dar seguimiento por más tiempo para confirmar la prevalencia del perfil de la microbiota del donador.

## 9. LIMITACIONES

- El uso de cápsulas requiere la cooperación y apego de los pacientes
- El número de participantes fue pequeño ya que el objetivo fue recolectar experiencia e información inicial con la elaboración de microbiota fecal liofilizada, su administración y efectividad en pacientes colonizados.

## 10. FORTALEZAS

- Para la selección del donador universal se siguieron algunas de las recomendaciones del Consenso Europeo para TMF y las presentadas por la FDA lo cual incluye la búsqueda de MDR.
- Este estudio muestra metodología detallada acerca del tratamiento previo de las heces para el TMF, así como el número de bacterias viables presentes en cada cápsula.
- Los estudios reportados sobre TMF se enfocan en la resolución de infección por *C. difficile* o la eliminación de MDR, sin embargo este estudio estuvo dirigido para pacientes colonizados por MDR y *C. difficile*.
- La mayoría de estudios solo reportan el número de pacientes descolonizados, sin embargo, en este estudio también se evaluó la microbiota intestinal para confirmar que hubo descolonización.

## 11. CONCLUSIONES

- La elaboración de microbiota fecal liofilizada para su administración en cápsulas es una alternativa efectiva y segura para el trasplante de microbiota fecal.
- El TMF puede erradicar bacterias multirresistentes que se encuentran colonizando el intestino, sin embargo se requiere mayor investigación y número de pacientes colonizados por *C. difficile* para evaluar el efecto que ejerce el TMF
- No hubo diferencia en la administración de cuatro u ocho cápsulas con microbiota fecal liofilizada
- El TMF genera cambios en la microbiota intestinal, aumenta su diversidad y establece en su receptor un perfil similar a la del donador.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Pamer E. (2016). Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science*, 352(6285), 535–538
2. Woodworth, M, Hayden, M, Young, V, & Kwon, J.(2019).The Role of Fecal Microbiota Transplantation in Reducing Intestinal Colonization With Antibiotic-Resistant Organisms: The Current Landscape and Future Directions. *Open forum infectious diseases*, 6(7)
3. Hamilton M, Weingarden A, Sadowsky M, Khoruts A.(2012). Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol*, 107(5), 761-7
4. Staley C. et al. (2017). Successful Resolution of Recurrent *Clostridium difficile* Infection using Freeze-Dried, Encapsulated Fecal Microbiota; Pragmatic Cohort Study. *Am J Gastroenterol*, 112(6):940-947
5. Youngster et al. (2016). Oral, frozen fecal microbiota transplant (FMT) capsules for recurrent *Clostridium difficile* infection. *BMC Medicine*, 14:134
6. Rodríguez D, Mirelis B, Navarro F. (2013) Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*;31(4):254–263
7. Rupnik M, Wilcox M, Gerding N (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*; 7: 526–536
8. Álvarez D. et al. (2018).Present and past perspectives on *Clostridium difficile* infection. *Revista de Gastroenterología de México*.83(1):41-50
9. Rodríguez A, Hernández L, Sandoval P, Salazar J. (2018) Diarrea por *Clostridium difficile* en pacientes hospitalizados. *Med Int Méx*;34(1):9-18
10. Crobach M, Vernon J, Ling Yuan Kong V, Péchiné S, Wilcox M, Kuijper E. (2018) Understanding *Clostridium difficile* Colonization. *Clinical Microbiology Reviews*; 31 (2)
11. Seekatz A, Young V. (2014). *Clostridium difficile* and the microbiota. *J Clin Invest*. 124(10):4182-4189
12. Brendan K, Tebas P. (2018).Clinical Practice and Infrastructure Review of Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile* Infection. *Journal CHEST*;153(1) 266-277
13. Meyer L, Espinoza R, Quera R. (2014)Infección por *Clostridium difficile*: epidemiología, diagnóstico y estrategias terapéuticas. *Rev. med. clin. condes* ; 25(3) 473-484
14. González N, Gómez J, Martínez J. (2005).Diagnóstico, tratamiento y control de la infección causada por *Clostridium difficile*. *Rev Esp Geriatr Gerontol.*;40(5):310-9
15. Teerver E et al. (2017).Detection of *Clostridium difficile* in feces of asymptomatic patients admitted to the hospital. *J Clin Microbiol*; 55:403-411
16. Drudy D, Fanning S, Kyne L. (2007). Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Intern J Infect Dis*; 11: 5-10.
17. Dubois T et al. (2019) A microbiota-generated bile salt induces biofilm formation in *Clostridium difficile*. *Biofilms and Microbiomes*; 5:14.
18. Sabah S. (2015).Antibiotic associated diarrhea. *Rev. Med. Clin.Condes*; 26(5) 687-695

19. Rifkin GD, Silva Jr J, Fekety FR, Sack RB. Antibiotic induced colitis. Implication of a toxin neutralized by *Clostridium sordelli* antitoxin. *Lancet*. 1977;2:1103–6.
20. Thelestam M., Chaves-Olarte E. (2000) Cytotoxic Effects of the *Clostridium difficile* Toxins. In: Aktories K., Wilkins T.D. (eds) *Clostridium difficile*. Springer Current Topics in Microbiology and Immunology; 250.
21. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:247–63.
22. Schoentaube J., Olling A., Tatge H., Just I. and Gerhard R.: Serine-71phosphorylation of Rac1/Cdc42 diminishes the pathogenic effect of *Clostridium difficile* toxin A, *Cel Microbiol*, 2009; 11(12):1816-1826.
23. Giesemman T., Egerer M., Jank T. and Aktories K.: Processing of *Clostridium difficile* toxins, *J Med Microbiol*, 2008; 57: 690-696.
24. Bobak D.A.: The molecular pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated disease, *Curr Infect Dis Rep*, 2008; 10(2):111-115.
25. Cookson B.: Hypervirulent strains of *Clostridium difficile*, *Postgr Med J*, 2007; 83 (979): 291-295.
26. Gagliardi A et al.(2018) Rebuilding the gut microbiota ecosystem. *Int. J. Environ. Res. Public Health*; 15: 1679.
27. Guarner F, Malagelada J. (2003). La flora bacteriana del tracto digestivo. *Gastroenterol Hepatol*; 26:1-5
28. Khanna S. (2018) Microbiota Replacement Therapies: Innovation in Gastrointestinal Care. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 103: 102-111
29. Alarcón P, González M, Castro E.(2016) Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Rev Med Chile*; 144: 910-916
30. Heath et al.,(2018) Fecal microbiota transplantation and its potential therapeutic uses in gastrointestinal disorders. *Northern clinics of Istanbul*, 5(1), 79–88.
31. Youngster I et al., (2014).Fecal Microbiota Trasplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open label, controlled pilot study. *Clinical Infectious diseases*; (11): 1515-22
32. Hagel S, Stallmach A, Vehreschild M (2016). Fecal Microbiota Trasplant in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Dtsch Arztebl Int*; 113:583-9.
33. Tian H, Ding C, Gong J, Wei Y, McFarland L, Li N.(2015)Freeze-dried, capsulized fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection. *J Clin Gastroenterol*; 49:6
34. Crum N, Sullivan E, Ballon G. (2015) Fecal Microbiota Trasplantation and Successful resolution of multidrug-resistant-organism colonization. *Journal of Clinical Microbiology*; 53:6.
35. Woodworth M, Hayden M, Young V, Kwon J. (2019) The Role of Fecal Microbiota Transplantation in Reducing Intestinal Colonization With Antibiotic-Resistant Organisms: The Current Landscape and Future Directions. *Open Forum Infectious Diseases*.
36. Laffin M, Millan B, Madsen K.(2017). Fecal microbial transplantation as a therapeutic option in patients colonized with antibiotic resistant organisms. *Gut Microbes*;8:3 221–224
37. Millan B et al.(2016) Fecal microbial transplants reduce antibiotic resistant genes in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases*; 6:62
38. Dubberke E, Olsen M. (2012) Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. *Clinical Infectious Diseases*;55:2:88-92.

39. Crum N, Sullivan E, Ballon G. (2015) Fecal Microbiota Trasplantation and Successful resolution of multidrug-resistant-organism colonization. *Journal of Clinical Microbiology*; 5:6
40. Torres Gonzalez et al. (2015) Factors Associated to Prevalence and Incidence of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Fecal Carriage: A Cohort Study in a Mexican Tertiary Care Hospital. *Plos One*
41. Gupta S, Vercoe E, Petrof E. (2016) Fecal Microbiota trasplantation: in perspective. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*; 9:2.
42. Stalenhof J E et al. Fecal Microbiota Transfer for Multidrug-Resistant Gram-Negatives:A Clinical Success Combined With Microbiological Failure. *Open Forum Infectious Diseases*
43. Singh R, et al. (2018) Fecal microbiota trasplantation against intestinal colonization by extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: a proof of principle study. *Biomed Central Res Notes*; 11:190
44. Woodworth M, Hayden M, Young V, Kwon J. (2019) The role of fecal microbiota trasplantation in reducing intestinal colonization with antibiotic-resistant organisms: The current Landscape and Future directions. *Open Forum Infectious Diseases*.
45. Tariq R et al. (2017) Fecal Microbiota Trasplantation for Recurrent *Clostridium difficile* infection reduces recurrent urinary tract infection frequency. *Clinical Infectious Diseases*; 65:1745-1747
46. Lee C et al. (2016) Frozen vs Fresh fecal microbiota tranplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection a randomized clinical trial. *JAMA*; 315: 142-149
47. Munita J, Arias C. (2016) Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.*; 4(2)
48. Woodworth M, Hayden M, Young V, Kwon J.(2019) The Role of Fecal Microbiota Transplantation in Reducing Intestinal Colonization With Antibiotic-Resistant Organisms: The Current Landscape and Future Directions. *Open Forum Infectious Diseases*
49. Zuo T. et al. (2018) Gut fungal dysbiosis correlates with reduced efficacy of fecal microbiota trasplantation in *Clostridium difficile* infection. *Nature Communications*; 9:3663
50. Donskey C. et al.(2000) Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *New England Journal of Medicine*; 343:1925-32
51. Abreu T. et al.(2018) Consensus on the prevention, diagnosis, and treatment of *Clostridium difficile* infection. *Revista de Gastroenterología de México*; 84:2
52. Centers for Disease Control and Prevention. (2020) Exploring new approaches to diagnose *Clostridioides difficile* infectios.
53. Dávila L. (2017) Increasing rates of *Clostridium difficile* infection in Mexican hospitals. *Braz j infect dis*;2 1(5):530–534
54. Rayo Montero O et. (2016) *Clostridium difficile* outbreak caused by NAP1/BI/027 strain and non-027 strains in a Mexican hospital. *Braz j infect dis*;2 0(1):8–13
55. Tamez K et al. (2017) *International Journal of Infectious Diseases*; 65: 44–49

56. Stripling J, Kumar R, Baddley J, et al.(2015) Loss of vancomycin resistant *Enterococcus fecalis* dominance in an organ transplant patient with *Clostridium difficile* colitis after fecal microbiota transplant. *Open Forum Infect Dis*;2
57. Dubberke E, Mullane K, Gerding D, et al.(2016). Clearance of vancomycin-resistant *Enterococcus* concomitant with administration of a microbiota-based drug targeted at recurrent *Clostridium difficile* infection. *Open Forum Dis*;3.
58. Schubert A et al. (2013) Microbiome data distinguish patient with *Clostridium difficile* infection and non *C. difficile* –associated diarrhea from healthy controls. *MBio*; 5(3).
59. Hamilton M, et al. (2013) High-throughput DNA sequence analysis reveals stable engraftment of gut microbiota following transplantation of previously frozen fecal bacteria. *Gut Microbes*;4(2): 125-135
60. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H et al.(2017) European Consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*; 66:569-580
61. Saha S, Tariq R, Tosh P, Pardi D, Khanna S.(2019) Faecal microbiota transplantation for eradicating carriage of multidrug-resistant organisms: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*;25: 958-963
62. Staley C, Vaughn B, Graiziger C et al.(2017) Community dynamics drive punctuated engraftment of the fecal microbiome following transplantation using freeze-dried, encapsulated fecal microbiota. *Gut microbes*; 8,( 3): 276–288
63. Kelly D, Yang L, Pei Z.(2018) Gut Microbiota, Fusobacteria, and Colorectal Cancer. *Diseases*;6(4):109.
64. Fukui H. (2019). Role of Gut Dysbiosis in Liver Diseases: What Have We Learned So Far?. *Diseases*;7(4):58.
65. Hiippala K, Jouhten H, Ronkainen A, et al. (2018) The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients*;10(8):988
66. Cocks K, Torgerson DJ.(2013) Sample size calculations for pilot randomized trials: a confidence interval approach. *J Clin Epidemiol*;66(2):197-201
67. Kim BR, Shin J, Guevarra R, et al. (2017) Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol*;27(12):2089-2093.
68. Patrick D. Schloss, Sarah L. Westcott.(2011).Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*: 77 (10) 3219-3226
69. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100,29<sup>th</sup> ed.2019
70. Nielsen C, Hagstrom S, Sorensen S. (2018) Interpersonal variations in gut microbiota profiles supersedes the effect of differing fecal storage conditions. *Scientific Reports*;8:17367
71. Tamez K, Ponce de Leon A, Torres P. et al. (2020).High prevalence of MDR gram-negative bacteria in feces of healthy blood donors in Mexico. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39, 1439–1444.
72. Ramandeep S, et al.(2018). Fecal microbiota transplantation against intestinal colonization by extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: a proof of principle study. *BMC Res Notes*;11: 190
73. Capsugel:<https://www.capsugel.com/consumer-health-nutrition-products/vcaps-capsules>
74. Bartlett J. (2017). Bezlotoxumab — A New Agent for *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med* ,376;4

## 12.ANEXOS

### 12.1 ANEXO 1: Cuestionario para Donador Universal

#### CUESTIONARIO DONADOR

FECHA: \_\_\_\_\_

Ficha de identificación

Nombre del candidato: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Originario de: \_\_\_\_\_ Residencia (últimos 5 años): \_\_\_\_\_

Estado civil: \_\_\_\_\_ Ocupación: \_\_\_\_\_ Escolaridad: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Teléfono. Opción 1: \_\_\_\_\_ Opción 2: \_\_\_\_\_ Opción 3: \_\_\_\_\_

Antecedentes Personales

Tiene Usted antecedentes familiares de diabetes mellitus, enfermedades crónico-degenerativas y/o cáncer de colon:

SI  NO ¿Cuál?

¿Con cuantas personas convive en casa?; presenta hacinamiento:

Convive con animales, como perros, gatos, ganado:

Datos clínicos compatibles con síndrome de intestino irritable:

- dolor abdominal recurrente al menos 3 días por mes
- asociado con un cambio en la frecuencia o forma de las heces
- mejora con la defecación

Patrón de evacuaciones, cumple 2 o más de los siguientes\*:

- esfuerzo durante al menos el 25% de defecaciones
- heces grumosas o duras en al menos el 25% de defecaciones
- sensación de evacuación incompleta durante al menos el 25% de las defecaciones
- sensación de obstrucción anorrectal durante al menos el 25% de las defecaciones
- maniobras manuales para facilitar al menos el 25% de las defecaciones
- menos de 3 defecaciones por semana

+ las heces blandas rara vez están presentes sin el uso de laxantes.

Ingestión de alcohol frecuencia y cantidad:

Tabaquismo.  SI  NO ; si, cuántos al día:

Toxicomanías:

Su dieta principalmente es a base de (carne roja, vegetales, etc), frecuencia:

Si consume leche, esta empaquetado o directamente de la vaca:

Tratamiento dental en las últimas 72 horas:

Cirugía mayor en los últimos 6 meses:

Cirugía menor en los últimos 3 meses:

Inmunizaciones, última aplicación de vacuna y cuál:

Alergias:

Ha hecho donaciones previas:  SI  NO



Fecha y lugar de última donación (tiene los resultados):

Número de donaciones al año:

Le han transfundido sangre (causa y donde).  SI  NO

Le han trasfundido tejidos o células (causa y donde).  SI  NO

Contacto en el último año con enfermos de hepatitis o SIDA.  SI  NO

Le han realizado la prueba de detección de VIH y hepatitis en alguna ocasión.  SI  NO

Cuál fue el resultado:

Ha estado o viajado a zonas endémicas de zika, Chikungunya o dengue (últimos 5 años):

Antecedentes patológicos, ¿Sabe Usted si tiene alguna de las siguientes enfermedades?

Se ha enfermado o está enfermo de los riñones:

Tiene alguna enfermedad pulmonar:

Hepatitis:

Tiene alguna enfermedad como leucemia o linfoma:

Tiene alguna enfermedad neurológica:

Ha tenido o tiene cáncer:

Hiper o hipotensión arterial:

Le han diagnosticado en alguna ocasión brucelosis:

Le han diagnosticado tuberculosis:

Le han diagnosticado paludismo:

Le han diagnosticado dengue:

Le han diagnosticado toxoplasmosis:

Le han diagnosticado enfermedad de Chagas:

Le han diagnosticado lepra:

Esta enfermo de diabetes mellitus:

Le han diagnosticado epilepsia o ha convulsionado en alguna ocasión:

Ha presentado alteraciones mentales/ síndrome demencial, autismo, trastorno psiquiátrico:

Le han realizado algún tipo de trasplante:

Prácticas de riesgo

Ha usado alguna droga:  SI  NO ¿Cuáles?

Cuántas parejas sexuales ha tenido en los últimos 5 años:

Todas las parejas han sido hombres y/o mujeres?

Ha tenido contacto sexual casual en el último año:  SI  NO ¿cuántas veces?

Ha tenido Internamiento en institutos penales o mentales:  SI  NO

Se ha realizado acupuntura, tatuajes o perforaciones en el último año:  SI  NO

Le han diagnosticado o dado tratamiento para enfermedades de transmisión sexual (sífilis, gonorrea, infección por *Chlamydia trachomatis*, virus del papiloma humano, herpes genital, VIH)

SI  NO si la respuesta fue sí, mencione cual y que tratamiento tuvo:

¿En los últimos 6 meses ha presentado alguna de las siguientes enfermedades?

Diarrea crónica (definida como heces sueltas con duración mayor de 4 semanas):

Pérdida de peso mayor al 15% (cuanto pesaba hace 6 meses), si sí hubo pérdida de peso fue de manera no intencionada:

Herpes mucocutáneo, Adenomegalias  SI  NO

Ha consumido antibióticos (penicilina, amikacina, gentamicina, clindamicina, vancomicina, cefalexina, cefuroxima, ceftriaxona, meropenem, ertapenem, imipenem, claritromicina, azitromicina, metronidazol), antiparasitarios (nitaxozanida, albendazol, mebendazol, tinidazol) o probióticos (Yakult, Activecomplex flora, Bacilac infantil, Casenbiotic) .  SI  NO

Cuál y por cuanto tiempo:

Ha consumido omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, ranitidina;  SI  NO

Cuál y por cuanto tiempo:

Ha tenido algún internamiento en algún hospital.  SI  NO

¿causa, en dónde y por cuánto tiempo?

Exploración física

Signos vitales. FC: FR: TA: Temp.

Neurológico:

Piel y tegumentos: \_\_\_\_\_

Cardiopulmonar: \_\_\_\_\_

Abdomen, visceromegalias: \_\_\_\_\_

Adenomegalias: \_\_\_\_\_

Somatometría

Peso: \_\_\_\_\_

Talla: \_\_\_\_\_

IMC (<25): \_\_\_\_\_

## 12.2 ANEXO: Consentimiento Informado Donador



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:

### Una nueva estrategia de prevención de infección por *Clostridium difficile* y colonización por microorganismos multirresistentes: autotrasplante de microbiota fecal **DONADOR**

FECHA DE PREPARACIÓN: 04-JUL-2018, VERSIÓN 1

**Investigador principal:** DR JOSE SIFUENTES OSORNIO

**Dirección del investigador:** Av. Vasco de Quiroga 15, Col Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan, Ciudad de México, CP 14080

**Teléfono de contacto del investigador:** 55 5487 0900 ext 2111, urgencias 24 hrs 5530455697

**Investigadores participantes:** Dr. Pedro Torres González, Dra. Karla María Tamez Torres, Dr. Alfredo Ponce de León Garduño, Dra. Miriam Bobadilla del Valle, Dr. David Kershenobich Stalnikowitz, Dr. Arturo Galindo Fraga, Dra. Nimbe Torres y Torres, Dr. Armando Tovar Palacio.

**Nombre del patrocinador del estudio:** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

**Dirección del patrocinador:** Av. de los Insurgentes Sur 1582, Crédito Constructor, 03940 Benito Juárez, CDMX

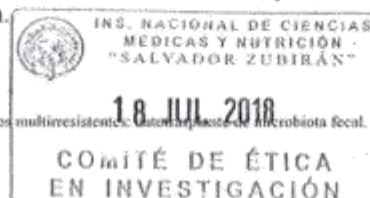
#### INTRODUCCIÓN:

Este documento es una invitación a participar en un estudio de investigación del Instituto. Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento; pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Procedimiento para dar su consentimiento. Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar o no como sujeto de investigación en este proyecto. El investigador le debe explicar ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y **usted tendrá todo el tiempo que requiera para pensar, solo o con quien usted decida consultarlo, antes de decidir si acepta participar.** Cualquiera que sea su decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Instituto.

Con el fin de tomar una decisión verdaderamente informada sobre si acepta participar o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los posibles riesgos y beneficios a su salud al participar. Este documento le dará información detallada acerca del estudio de investigación, la cual podrá comentar quien usted quiera, por ejemplo un familiar, su médico tratante, el investigador principal de este estudio o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final, una vez leída y entendida esta información, se le invitará a que forme parte del proyecto y si usted acepta, sin ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki, y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.



Al final de la explicación, usted debe entender los puntos siguientes:

- I. La justificación y los objetivos de la investigación.
- II. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de qué son procedimientos experimentales.
- III. Los riesgos o molestias previstos.
- IV. Los beneficios que se pueden observar.
- V. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para usted
- VI. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
- VII. La libertad que tiene de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se afecte su atención y el tratamiento en el Instituto.
- VIII. La seguridad de que no se le va a identificar de forma particular y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
- IX. El compromiso del investigador de proporcionarle la información actualizada que pueda ser obtenida durante el estudio, aunque esto pudiera afectar a su disposición para continuar con su participación.
- X. La disponibilidad del tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación.

**Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de tomar una decisión final en los días futuros.**

## INVITACION A PARTICIPAR COMO SUJETO DE INVESTIGACION Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Estimado(a) Sr(a). \_\_\_\_\_

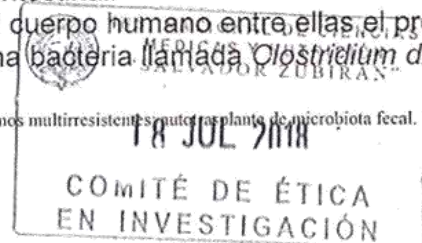
El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), a través del grupo de investigación, le invitan a participar como sujeto de investigación.

Usted fue invitado al estudio debido a que tiene las siguientes características:

- Usted tiene más de 18 años y menos de 50 años de edad
- Usted tiene índice de masa corporal menor de 30kg/m<sup>2</sup>
- Usted no tiene familiares (mamá, papá, hermanos) que padezcan diabetes mellitus, cáncer.
- Usted no consume alcohol en exceso
- Usted no fuma ni consume drogas
- Usted no ha consumido antibióticos en los últimos 6 meses
- Usted no ha estado en un hospital en los últimos 6 meses
- Usted tiene hábitos intestinales regulares
- Usted no padece ninguna enfermedad crónica
- Usted no tiene historia de internamientos hospitalarios o procedimientos quirúrgicos mayores
- Usted no ha tomado medicamentos que dañen la microbiota intestinal (flora intestinal)
- Usted no se ha realizado tatuajes en los últimos 6 meses
- Usted no ha tenido algún contacto sexual no protegido en los últimos 6 meses.

Los antibióticos, aunque al momento de una infección deben ser administrados para restaurar la salud, tienen algunos efectos indeseables como son el eliminar o disminuir la cantidad y la variedad de las bacterias que normalmente viven en el intestino de los humanos. A esta población de bacterias se le llama "microbiota intestinal", y también es conocida como flora intestinal.

La microbiota intestinal tiene muchas funciones benéficas en el cuerpo humano entre ellas, el proteger contra algunas enfermedades como es la diarrea asociada a una bacteria llamada *Clostridium difficile*.





Esta bacteria, habita normalmente en el intestino de las personas o bien se adquiere por contacto con personas que la albergan en su intestino o con los hospitales. Normalmente, la bacteria no causa enfermedad debido a que su cantidad en el intestino es limitada, pero al ser eliminadas las bacterias que normalmente habitan en el intestino, por acción de los antibióticos, el *C. difficile* predomina y produce toxinas ocasionan diarrea a veces grave y que puede conducir el enfermo a la muerte si no se atiende a tiempo. Así mismo, al alterarse la microbiota intestinal por acción de los antibióticos, se facilita la adquisición de bacterias que se encuentran dentro de los hospitales y que ya son resistentes a los antibióticos, esto se llama colonización por bacterias resistente a antibióticos. Un enfermo que se hospitaliza y recibe antibióticos tiene una probabilidad de 2 en 10 de colonizarse por una bacteria resistente a antibióticos de las que habitan en los hospitales y a largo plazo, estas bacterias pueden desplazarse a otros sitios como pulmones, las vías urinarias, piel y otros órganos, y causar enfermedad, lo cual en muchas ocasiones requerirá de hospitalizaciones prolongadas para ser tratada con antibióticos de amplio espectro algunos de los cuales tienen efectos secundarios. Por lo anterior, y en vista de que debemos cuidar los antibióticos, evitando el desarrollo de enfermedades que nos obliguen a utilizarlos, hemos diseñado una estrategia, la cual ya se utiliza para curar la enfermedad por *C. difficile* (un tipo de diarrea asociada a los antibióticos) en muchos países, llamada trasplante de microbiota intestinal. El objetivo de este estudio es evaluar la seguridad y la utilidad de cápsulas creadas a partir de las bacterias que habita en el intestino "sano" (microbiota intestinal) y que pudieran evitar enfermedades relacionadas con la administración de antibióticos de amplio espectro. Durante este estudio, usted participará como donador sano de esta microbiota intestinal, la cual se encuentra en sus heces, y que será utilizada, en forma de polvo y dentro de cápsulas, ya sea para curar a personas con estas enfermedades en su intestino, o bien, para evitar dichas enfermedades. Las cápsulas serán preparadas con métodos estandarizados e internacionalmente utilizados.

### Procedimientos del Estudio

Le realizaremos un cuestionario mediante una entrevista, con duración de aproximadamente 20 minutos para conocer sus antecedentes de salud, así como antecedentes familiares.

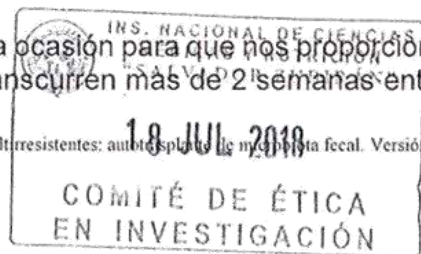
En la visita de inicio o tamizaje le solicitaremos una muestra de sus heces, o en caso de que ese día no pueda proporcionarla, le solicitaremos autorización para realizar un hisopado rectal (lo cual consiste en introducir un cotonete o hisopo unos milímetros dentro del orificio anal, por menos de 10 segundos) para detectar si se encuentra colonizado (si es portador) de las bacterias resistentes a antibióticos y *Clostridium difficile* que buscamos evitar. Este resultado, tarda 72 horas aproximadamente en estar disponible para los investigadores.

En caso de que Usted no se ha portador de bacterias resistentes, le realizaríamos unos estudios de laboratorio que incluyen búsqueda de virus, bacterias y parásitos que pudieran causar enfermedad y que también se les encuentra colonizando, así mismo le tomaremos una muestra de sangre, para descartar la presencia del virus de hepatitis A, B ó C así como VIH y sífilis, es decir otras enfermedades que pueden transmitirse por vía intestinal.

Si Usted resulta ser portador de bacterias resistentes a antibióticos, será excluido del estudio como donador, y le haremos de su conocimiento el resultado del estudio. Cabe señalar que el papel de la colonización por bacterias resistentes en personas sanas como Usted no requiere ningún tratamiento ni implica un riesgo para su salud ni existe un tratamiento o indicación para erradicarlo en estos momentos.

Si usted resulta adecuado como donador, después de la evaluación, le solicitaremos acuda al Laboratorio de Microbiología Clínica del INNCSMZ para que nos proporcione una muestra de heces fresca en 2 días consecutivos. Para ello le proporcionaremos un contenedor especial. Esa muestra la procesaremos y extraeremos la microbiota para en el futuro proporcionársela a otros pacientes.

Le solicitamos que nos permita contactarlo en una segunda o tercera ocasión para que nos proporcione nuevamente muestras de heces, en caso de que se requiera. Si transcurren más de 2 semanas entre





las muestras que nos proporcione, le aplicaremos un cuestionario breve para conocer si en esas dos semanas a consumido antibióticos u otros medicamentos que pudieran afectar la muestra, así como nuevamente detectaremos si es o no portador de bacterias resistentes.

Las responsabilidades de los participantes en este protocolo incluyen informar los datos requeridos durante las entrevistas y entregar las muestras de heces según las indicaciones del equipo de investigadores.

## **RIESGOS E INCONVENIENTES**

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala que la toma de muestras biológicas (excremento, en este caso) es de riesgo mínimo. No tendrá ninguna molestia para usted, más que el recolectar las heces. En el caso de que se requiera realizar un hisopado rectal por no poder obtener una muestra de materia fecal, es un procedimiento que dura pocos segundos el cual puede generar dolor leve o molestia el cual por lo general no requiere de ningún tratamiento y el riesgo de alguna lesión es mínimo. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente puede producirse punción arterial la cual ocasiona mayor dolor. El personal que extraerá la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimizará los riesgos de complicaciones. Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.

## **BENEFICIOS POTENCIALES**

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Además, gracias a su participación altruista, su comunidad se puede beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de evitar las infecciones por bacterias resistentes y conservar la efectividad de los antibióticos. En caso de que su muestra nos sea útil para producir cápsulas, su participación impactará positivamente en la curación de muchos pacientes en el futuro.

## **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

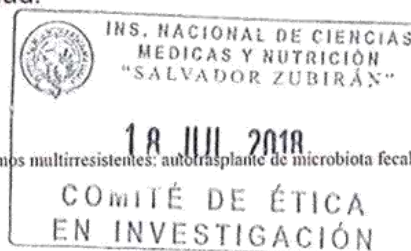
No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno. El investigador no podrá cubrir los gastos de su transporte al Instituto. Todos los estudios de laboratorio relacionados con este estudio no tendrán costo para Usted.

## **COMPENSACION**

Si llegara a presentarse alguna complicación como resultado directo de su participación en este estudio, por parte del protocolo le proporcionaremos el tratamiento inmediato y lo referiremos, si es necesario, al especialista médico que requiera.

## **ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:**

Su participación es voluntaria. Por lo que usted puede elegir no participar en el estudio. Usted será informado de los resultados de los exámenes que se le hayan realizado hasta el momento en que decidió suspender su participación. En caso de que detectemos la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en sus heces, sin que éstas le ocasionen molestias, lo cual se denomina colonización, usted debe saber que este estado no implica riesgo para su salud.





### **POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:**

Los resultados o materiales obtenidos en el estudio serán propiedad del INCMNSZ. Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto o quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero por el mismo.

### **ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:**

Usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del estudio al Dr. José Sifuentes Osornio o a la Dra. Karla María Tamez Torres del INCMNSZ (tel.5554870900 ext. 5865 y 5870) La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

### **PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:**

Recuerde que su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho no se verán afectados. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento. Se le informará a tiempo si se obtiene nueva información que pueda afectar su decisión para continuar en el estudio.

### **CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN**

Su nombre no será usado en ninguno de los reportes públicos del estudio. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y serán codificadas con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal, las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas, así como su información médica y/o genética, puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto, y estos estudios deberán ser sometidos a aprobación por un Comité de Ética.

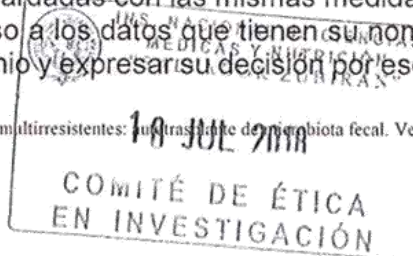
Sus muestras incluidas las capsulas realizadas a partir de sus heces, podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por dos años a partir de su obtención.

Los códigos que identifican su muestra estarán sólo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Sólo los investigadores tendrán acceso a ellos. El personal del estudio (monitores o auditores) podrá tener acceso a la información de los participantes.

Si bien existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio, su confidencialidad será protegida como lo marca la ley, asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o
- Es solicitado por la ley.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre. Si así lo desea, usted deberá contactar al Dr. José Sifuentes Osornio y expresar su decisión por escrito.





El Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ aprobó la realización de este estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con el Comité de Ética en Investigación para decidir la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice contactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

Si usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio.

En caso de que el estudio incluya la evaluación de un medicamento o dispositivo experimental, el patrocinador debe informar de inmediato al INCMNSZ los resultados de los monitoreos (revisiones) del estudio que podrían afectar a la seguridad de los participantes, y que podría afectar la disposición para continuar participando o podría alterar la aprobación del Comité de Ética en Investigación para continuar el estudio. Cuando los resultados afectan directamente la seguridad o la atención médica de los participantes el patrocinador o el investigador responsable deberán comunicar los resultados de los estudios de investigación a los participantes.

**IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:**

En caso de que usted sufra un daño relacionado al estudio, por favor póngase en contacto con el Dr. José Sifuentes Osornio o la Dra. Karla María Tamez Torres del INCMNSZ (tel.5554870900 ext. 5865 y 5870). Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con Dr. José Sifuentes Osornio o la Dra. Karla María Tamez Torres del INCMNSZ (tel.5554870900 ext. 5865 y 5870).

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ Dr. Arturo Galindo Fraga, teléfono: 54870900 ext. 6101).

**DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

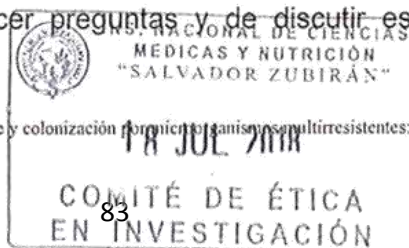
Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas (heces) para ser utilizadas en este estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas:

- |  | SÍ<br>(marque por favor) | NO<br>(marque por favor) |
|--|--------------------------|--------------------------|
| a. ¿Ha leído y entendido el formato de consentimiento informado, en su lengua materna? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |



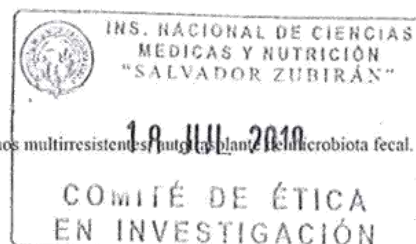


- |   | SÍ<br>(marque<br>por<br>favor) | NO<br>(marque<br>por<br>favor) |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho? | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| f. ¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?   | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| g. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| h. ¿Ha discutido usted otras opciones de tratamiento con el médico participante en el estudio y entiende usted que otras opciones de tratamiento están a su disposición?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| i. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| j. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que usted no siguió los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?                 | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| k. ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento para sus registros personales?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |

**Declaración** del **paciente:** Yo, \_\_\_\_\_ declaro que es mi decisión participar como sujeto de investigación clínica en el estudio. Mi participación es voluntaria.

Se me ha informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica ni en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en este estudio. También puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si así los solicito.

Si tengo preguntas sobre el estudio, puedo ponerme en contacto con el Dr. José Sifuentes Osornio o con la Dra. Karla María Tamez Torres del INCMNSZ (tel.5554870900 ext. 5865 y 5870).



Debo informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud (por ejemplo, uso de nuevos medicamentos, cambios en el consumo de tabaco) o en la ciudad donde resido, tan pronto como sea posible.

He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Tengo claro que, en caso de tener preguntas sobre mis derechos como sujeto de investigación clínica en este estudio, problemas, preocupaciones o dudas, y deseo obtener información adicional, o bien, hacer comentarios sobre el desarrollo del estudio, tengo la libertad de hablar con el presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga, tel: 54870900. ext. 6101).

\_\_\_\_\_  
Nombre del / de la Participante

\_\_\_\_\_  
Firma del / de la Participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Coloque la huella digital del participante sobre esta línea si no sabe escribir

\_\_\_\_\_  
Nombre del representante legal (si aplica)

\_\_\_\_\_  
Firma del representante legal

\_\_\_\_\_  
Fecha

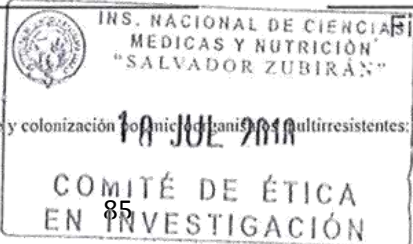
\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador  
que explicó el documento

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha

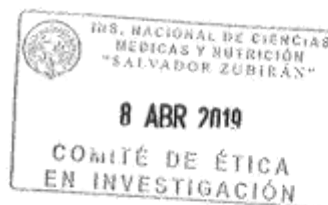
\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo 1





## 12.3 ANEXO 3: Consentimiento informado paciente



**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:**  
**Una nueva estrategia de prevención de infección por *Clostridium difficile* y colonización por microorganismos multirresistentes: trasplante de microbiota fecal (estudio piloto)**

FECHA DE PREPARACIÓN: 07-MARZO-2019, VERSIÓN 3.1

**Investigador principal:** DR JOSE SIFUENTES OSORNIO

**Dirección del investigador:** Av. Vasco de Quiroga 15, Col Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan, Ciudad de México, CP 14080

**Teléfono de contacto del investigador:** 55 5487 0900 ext 2111, urgencias 24 hrs 5530455697

**Investigadores participantes:** Dr. Pedro Torres González, Dra. Karla María Tamez Torres, Dr. Esteban Pérez García, Dr. Alfredo Ponce de León Garduño, Dra. Miriam Bobadilla del Valle, Dr. David Kershenobich Stalnikowitz, Dr. Arturo Galindo Fraga, Dra. Nimbe Torres y Torres, Dr. Armando Tovar Palacio.

**Nombre del patrocinador del estudio:** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

**Dirección del patrocinador:** Av. de los Insurgentes Sur 1582, Crédito Constructor, 03940 Benito Juárez, CDMX

### INTRODUCCIÓN:

Este documento es una invitación a Usted para participar en un estudio de investigación del Instituto. Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento; pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Procedimiento para dar su consentimiento. Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar o no como sujeto de investigación en este proyecto. El investigador le debe explicar ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y **Usted tendrá todo el tiempo que requiera para pensar, solo o con quien Usted decida consultarlo, antes de decidir si acepta o no participar**. Cualquiera que sea su decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Instituto.

Con el fin de tomar una decisión verdaderamente informada sobre si acepta participar o no en este estudio, Usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los posibles riesgos y beneficios a su salud al participar. Este documento le dará información detallada acerca del estudio de investigación, la cual podrá comentar con quien Usted quiera, por ejemplo un familiar, su médico tratante, el investigador principal de este estudio o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final, una vez leída y entendida esta información, se le invitará a que forme parte del proyecto y si Usted acepta, sin ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki, y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Al final de la explicación, usted debe entender los puntos siguientes:

- I. La justificación y los objetivos de la investigación.
- II. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación que son procedimientos experimentales.
- III. Los riesgos o molestias previstos.
- IV. Los beneficios que se pueden observar.
- V. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para Usted
- VI. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación.
- VII. La libertad que tiene de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se afecte su atención y tratamiento en el Instituto.
- VIII. La seguridad de que no se le va a identificar de forma particular y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
- IX. El compromiso del investigador de proporcionarle la información actualizada que pueda ser obtenida durante el estudio, aunque esto pudiera afectar su disposición para continuar con su participación.
- X. La disponibilidad del tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación.

**Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de tomar una decisión final en los días siguientes.**

### INVITACION A PARTICIPAR COMO SUJETO DE INVESTIGACION Y DESCRIPCION DEL PROYECTO



Estimado(a) Sr(a). \_\_\_\_\_

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), a través del grupo de investigación, le invitan a participar como sujeto de investigación.

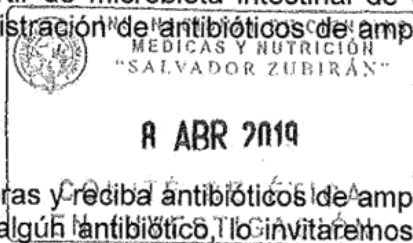
Usted fue invitado al estudio debido a que tiene las siguientes características:

- Ha estado hospitalizado por más de 72hrs o bien tiene un padecimiento al ingreso al instituto por el cual tiene posibilidad de ser hospitalizado por más de 72 horas
- Durante la hospitalización si recibe por vía intravenosa al menos 4 dosis de alguno de los siguientes antibióticos: piperacilina/tazobactam, ampicilina, dicloxacilina, amoxicilina/sulbactam, metronidazol, ampicilina/sulbactam, imipenem, ertapenem, meropenem, ciprofloxacino, levofloxacino, cefalotina, cefalexina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, vancomicina, clindamicina, linezolid, amikacina, daptomicina, trimetoprim/sulfametoxazol.
- No se le han realizado cirugías de colon en el último año y tiene colon funcional, es capaz de ingerir alimentos y medicamentos por vía oral.
- No tiene alergias a ningún alimento
- No padece enfermedades que debiliten su sistema inmunológico (en caso de tener Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana cuenta con CD4 mayor o igual de 200 células además de presentar carga viral indetectable, enfermedad renal crónica sin tratamiento sustitutivo, trasplante de órgano sólido menor a 1 año, cirrosis hepática sin datos de hipertensión portal y/o clasificado como CHILD C, cáncer como leucemia mieloide aguda y/o linfoma algún tipo de inmunodeficiencia primaria como enfermedad granulomatosa crónica o medicamentos que disminuyan su respuesta inmunológica como terapias biológicas ejemplo rituximab, infliximab, etc, así como uso de inmunosupresores como prednisona >5 mg/día, azatioprina >4 mg/kg/día, ciclofosfamida > 10 mg/kg/día, metrotexate 25 mg/kg/día, hidroxicloroquina > 5 mg/kg/día, leflunomida > 20 mg/día, tacrolimus > 0.15 mg/kg/día)
- En caso de ser mujer en edad fértil, no se encuentra embarazada.



Los antibióticos, aunque al momento de la enfermedad le deben ser administrados para restaurar su salud, tienen algunos efectos indeseables como eliminar o disminuir la cantidad y la variedad de las bacterias que normalmente viven en su intestino lo cual se denomina microbiota intestinal (también conocida como flora intestinal).

La microbiota intestinal tiene muchas funciones benéficas en el cuerpo humano entre ellas proteger contra algunas enfermedades como la diarrea asociada a una bacteria llamada *Clostridium difficile*. Esta bacteria, habita normalmente en el intestino de las personas o bien se adquiere por contacto con personas que la albergan en su intestino o que se encuentran en los hospitales. Normalmente, la bacteria no causa enfermedad debido a que su cantidad en el intestino es limitada, pero al ser eliminadas las bacterias que normalmente habitan en el intestino, por acción de los antibióticos, *C. difficile* predomina y produce toxinas que ocasionan diarrea que puede ser grave y llega a producir la muerte si no se atiende a tiempo. Así mismo, al alterarse la microbiota intestinal por acción de los antibióticos, se facilita la adquisición de bacterias que se encuentran dentro de los hospitales y se caracterizan por ser resistentes a los antibióticos, esto se llama colonización por bacterias resistentes a antibióticos. Un enfermo que se hospitaliza y recibe antibióticos tiene una probabilidad de 2 en 10 de colonizarse por una bacteria resistente a antibióticos de las que habitan en los hospitales y a largo plazo, estas bacterias pueden desplazarse a otros sitios como pulmones, vías urinarias, piel, otros órganos, y causar enfermedad, lo cual en muchas ocasiones requerirá de hospitalizaciones prolongadas para ser tratada con antibióticos de amplio espectro algunos de los cuales tienen efectos secundarios. Por lo anterior, y en vista de que debemos cuidar la administración de antibióticos, para evitar el desarrollo de enfermedades que nos obliguen a utilizarlos, hemos diseñado una estrategia, la cual ya se utiliza para curar la enfermedad por *C. difficile* (un tipo de diarrea asociada a los antibióticos) dicha estrategia se llama trasplante de microbiota intestinal. El objetivo de este estudio es estandarizar la dosis de la microbiota intestinal en cápsulas, producidas a partir de microbiota intestinal de un donador sano para evitar enfermedades relacionadas con la administración de antibióticos de amplio espectro.



### Procedimientos del Estudio

En caso de que Usted se encuentre hospitalizado por más de 72 horas y reciba antibióticos de amplio espectro por alguna infección, posterior a recibir cuatro dosis de algún antibiótico, lo invitaremos a participar de forma aleatorizada, es decir a manera de sorteo, en cualquiera de los siguientes cuatro grupos:

#### Grupo 1a.

Serán sujetos que recibirán una cápsula cada 12 horas durante dos días (cuatro cápsulas en total) Estas cápsulas serán elaboradas con anterioridad por nuestro grupo de investigación, en nuestro laboratorio. Estas cápsulas contendrán polvo, el cual resulta después de una serie de procedimientos que se realizan en las heces fecales (material fecal) de una persona que se eligió debido a que se encuentra en excelente estado de salud y debido a que sus heces fecales no representan riesgo alguno de transmitir infecciones. La intención de este, polvo es la de concentrar al máximo las bacterias del intestino de una persona sana, es decir, su contenido es un concentrado de la microbiota intestinal de una persona sana. Este polvo no tiene sabor ni olor, es de color café y será contenido en cápsulas opacas de color blanco.

#### Grupo 1b.

Recibirán una cápsula/ placebo que contendrá almidón (azúcar derivado de plantas, completamente seguro para su ingestión), las cuales serán idénticas a las que contienen el polvo de heces fecales, pero sin ingrediente activo y serán administradas en dosis de una cápsula cada 12 horas por dos días (cuatro cápsulas en total).

#### Grupo 2a.

Serán sujetos que recibirán dos cápsulas de polvo de heces fecales, cada 12 horas por dos días (ocho cápsulas en total).

#### Grupo 2b.

Recibirán dos cápsulas de almidón/ placebo cada 12 horas por dos días (ocho cápsulas en total).

En cualquiera de los casos Usted tiene igual probabilidad de recibir las cápsulas con polvo de microbiota o de placebo (50%). Para que nuestros datos sean válidos, requerimos de estudiar 32 pacientes. El tiempo que Usted permanecerá en el estudio es de tres meses a partir de que le sean administradas las cápsulas conteniendo la microbiota intestinal o el placebo.

Ni Usted ni los investigadores sabremos si está recibiendo las cápsulas de microbiota intestinal o placebo, sólo una persona del equipo de investigadores conocerá el código para que en caso de que se presente una reacción adversa podamos saber inmediatamente si está relacionado con las cápsulas de microbiota intestinal.

Su participación en el estudio consiste en 10 visitas o evaluaciones que se le realizarán por parte de los médicos del estudio, una vez que haya aceptado participar, así como firmado el consentimiento informado correspondiente. En la visita de inicio (visita uno), le solicitaremos una muestra de sus heces, o en el caso que ese día no pueda proporcionarla le solicitaremos autorización para realizar un hisopado rectal (lo cual consiste en introducir un cotonete o hisopo unos milímetros dentro del orificio anal, por menos de 10 segundos) para detectar si se encuentra colonizado (si es portador) de las bacterias resistentes a antibióticos y *Clostridium difficile* que buscamos prevenir. Este resultado, tarda 72 horas aproximadamente en estar disponible para los investigadores. Además de realizar un análisis basal de la cantidad y diversidad de la microbiota intestinal (las bacterias del intestino), e identificar el efecto que tiene la administración de las cápsulas.

En caso de ser mujer en edad fértil se realizará una prueba de embarazo en orina una vez cumplido con los criterios establecidos se solicitará conteste un cuestionario sencillo con la finalidad de conocer sus antecedentes de importancia para el estudio.

La visita dos realizaremos el sorteo para determinar si se le administrarán las cápsulas de microbiota o las cápsulas con placebo. En cualquiera de los casos, se le solicitará que ingiera 1 ó 2 cápsulas de polvo de microbiota intestinal (o placebo) cada 12 horas (dos veces al día) durante dos días, las cuales tomará solo con agua con dos horas de ayuno previo y se le solicitará no consumir ningún alimento durante las siguientes dos horas. Además, se le realizará una exploración física dirigida, así como evaluación de efectos adversos inmediatos.

La visita tres se realizará 24 horas después de la administración de las cápsulas, tendrá una duración de 20 minutos, se le realizará revisión clínica y cuestionario para identificar efectos relacionados con la administración de las cápsulas. En la visita cuatro que se realizará siete días después de la administración de las cápsulas le realizaremos una nueva revisión y cuestionario el cual tendrá una duración de 20 minutos, para conocer si presento alguna molestia o si durante este tiempo le fueron administrados antibióticos. También, le solicitaremos una nueva muestra de heces para conocer si existe aún colonización. La visita cinco, se realizará a los 14 días después de la administración de las cápsulas, tendrá una duración aproximada de 20 minutos y se le solicitará una muestra de heces para analizarla. Todas estas visitas serán calendarizadas, y le proporcionaremos los recipientes adecuados para el transporte de la muestra. Los horarios de las visitas serán de lunes a viernes de 8:00 a 17:00 horas en el 6º. piso de la UPA (unidad de pacientes ambulatorios) del INCMNSZ esto en caso de que Usted ya no se encuentre hospitalizado.

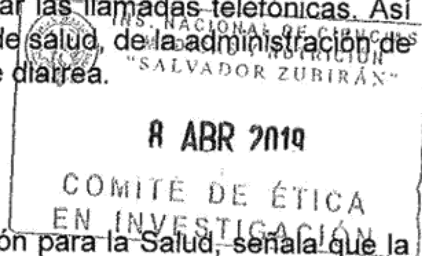
Después de la visita cinco le solicitamos nos permita contactarlo por vía telefónica cada dos semanas, por cinco ocasiones (visita 6 a la 10) para preguntarle si durante este tiempo ha tenido episodios de diarrea, si ha requerido hospitalización y/o tratamiento con antibióticos. La entrevista

tendrá una duración máxima de 10 minutos.

En caso de que Usted presente diarrea en cualquier momento del seguimiento del estudio, con la presencia de más de tres evacuaciones no formadas en 24 horas, le solicitaremos que nos contacte por teléfono para que acuda a valoración y nos proporcione una muestra de heces para buscar *C. difficile* y otros patógenos. No requerimos que durante el tiempo que se encuentre en el estudio observe una dieta en particular o modifique sus hábitos fuera de lo que le sea indicado por sus médicos.

Las intervenciones experimentales propuestas son la administración de cápsulas de microbiota intestinal. Las intervenciones incluidas en el estudio no son parte de su tratamiento habitual (estándar) requerido para su condición (colonización por bacterias resistentes a antibióticos y *C. difficile* o prevención de esta), estamos evaluando una forma de prevención, por lo tanto, no existe un tratamiento alternativo que ofrecer y en este punto desconocemos si este vaya a tener algún beneficio. De manera rutinaria solo se realizará la vigilancia en el caso de que aparezcan datos de infección. La evaluación de los episodios de diarrea que presente durante el seguimiento (cinco ocasiones por teléfono) sí forma parte del seguimiento estándar habitual de un paciente.

Sus responsabilidades como participante de este estudio incluyen: informar los datos requeridos durante las entrevistas, acudir a las visitas de seguimiento y contestar las llamadas telefónicas. Así como informar a los investigadores de cualquier cambio en su estado de salud, de la administración de cualquier medicamento durante el tiempo del estudio o la presencia de diarrea.



## RIESGOS E INCONVENIENTES

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala que la administración de un medicamento o productos biológicos como parte de estudio es de riesgo mayor dentro de la investigación. A este respecto con la administración de microbiota intestinal, se han informado como efectos secundarios diarrea, constipación (estreñimiento), cólicos, distensión abdominal y flatulencia, los cuales tienen una duración corta en la mayoría de los casos. Así mismo se han descrito cambios en el metabolismo y la propensión a enfermedades autoinmunes, al recibir microbiota intestinal derivada de enfermos con estas características, sin embargo, todas ellas serán descartadas en el o los sujetos que proporcionen heces para la fabricación de las cápsulas de microbiota intestinal. En el caso de que se requiera realizar un hisopado rectal por no poder obtener una muestra de materia fecal, es un procedimiento que dura pocos segundos el cual puede generar dolor leve o molestia en general no requiere de ningún tratamiento y el riesgo de alguna lesión es mínimo.

Si Usted es una mujer en edad fértil descartaremos que se encuentre embarazada al invitarla a participar en el estudio, mediante la realización de una prueba de embarazo en orina la cual no tendrá costo para Usted.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos Usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de confidencialidad, la cual está protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.

## BENEFICIOS POTENCIALES

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, en el caso de que la administración de las cápsulas de microbiota intestinal funcionen, podría evitarle hospitalizaciones prolongadas o infecciones por bacterias difíciles de tratar. Además, gracias a su participación altruista, su comunidad se puede beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de evitar las



infecciones por bacterias resistentes y conservar la efectividad de los antibióticos.

### **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno. El investigador no podrá cubrir los gastos de su transporte al Instituto. Todos los estudios de laboratorio relacionados con este estudio no tendrán costo para Usted, tampoco lo tendrá el análisis de las heces en caso de que Usted presente diarrea durante el seguimiento, sin embargo no cubrirá el tratamiento. Si presenta una infección por bacterias resistentes durante el seguimiento el costo de la atención de esta no será cubierto por el estudio.

### **COMPENSACIÓN**

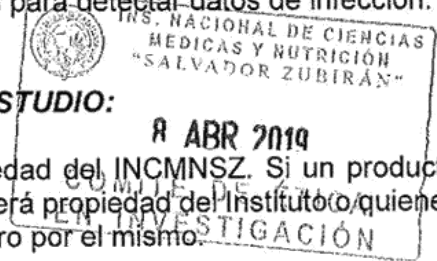
Si llegara a presentarse alguna complicación como resultado directo de su participación en este estudio, por parte del protocolo le proporcionaremos el tratamiento inmediato y lo referiremos, si lo amerita, al especialista médico que requiera. El protocolo por su parte puede cubrir la atención médica de las lesiones que se definan como directamente asociadas a la administración de las cápsulas de microbioma intestinal.

### **ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:**

Su participación es voluntaria. Por lo que Usted puede elegir no participar en el estudio. En caso de decidir no participar, Usted seguirá recibiendo el tratamiento o manejo habitual (estándar) para su enfermedad. El estado de colonización (portador) de las bacterias resistentes a antimicrobianos, no se realiza de manera rutinaria como parte de su atención, así como tampoco existe una estrategia rutinaria para prevenirla, por ello solo se brinda seguimiento a los pacientes para detectar datos de infección.

### **POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:**

Los resultados o materiales obtenidos en el estudio serán propiedad del INCMNSZ. Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto, quienes ellos designen. En tal caso, Usted no recibirá un beneficio financiero por el mismo.



### **ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:**

Usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del estudio al Dr. José Sifuentes Osornio (Tel. 5554870900 ext. 7501) o al Dr. Esteban Pérez García (Tel. 5554870900 ext. 5865, Cel. 55 82335845). La investigación es un proceso largo y complejo. Obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

### **PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:**

Recuerde que su participación es VOLUNTARIA. Si Usted decide no participar, tanto su relación habitual con el INCMNSZ como su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho no se verán afectados. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el INCMNSZ. Se le informará a tiempo si se obtiene nueva información que pueda afectar su decisión para continuar en el estudio.

El investigador o el patrocinador del estudio pueden excluirlo sin previo aviso, si en la visita cinco requiere que se le administre algún antibiótico adicional al conocido. El estudio puede darse por terminado en forma prematura si se demuestra que la administración de las cápsulas no es de utilidad, si se presentan efectos adversos graves mayores con respecto al grupo placebo o se agotan los recursos.

## CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN

Su nombre no será usado en ninguno de los reportes públicos del estudio. Las muestras biológicas obtenidas serán codificadas con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal, las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no será devuelta. Es posible que sus muestras biológicas, así como su información médica y/o genética, puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio y tampoco podrán ser utilizadas para estudios de investigación que estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto, dichos estudios deberán ser sometidos a aprobación por un Comité de Ética.

Sus muestras de heces podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por dos años a partir de su obtención.

Los códigos que identifican su muestra estarán sólo disponibles para los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Sólo los investigadores tendrán acceso a ellos.

Si bien existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio, su confidencialidad será protegida como lo marca la ley, asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o
- Es solicitado por la ley.

Si Usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre. Si así lo desea, Usted deberá contactar al Dr. José Sifuentes Osornio (Tel. 5554870900 ext. 7501) y expresar su decisión por escrito.

El Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ aprobó la realización de este estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con el Comité de Ética en Investigación para decidir la mejor forma de darle esta información a Usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice contactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

Si Usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio.

En caso de que el estudio incluya la evaluación de un medicamento o dispositivo experimental, el investigador principal debe informar de inmediato al INCMNSZ los resultados de las revisiones del estudio que podrían afectar la seguridad de los participantes, afectar la disposición para continuar participando o alterar la aprobación del Comité de Ética en Investigación para continuar con el estudio. Cuando los resultados afectan directamente la seguridad o la atención médica de los participantes, el Patrocinador o el Investigador responsable deberán comunicar los resultados de los estudios de investigación a los participantes.

### IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:

En caso de que usted sufra un daño relacionado al estudio, por favor póngase en contacto con el Dr. José Sifuentes Osornio (Tel. 5554870900 ext. 7501) o la Dra. Karla María Tamez Torres en el

INCMNSZ (Tel. 5554870900 extensión 5870, Cel. 81 1183 8084). Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con Dr. José Sifuentes Osornio, Dra. Karla María Tamez Torres en el INCMNSZ (Tel. 5554870900 extensión 5870 Cel. 81 1183 8084), Dr. Esteban Pérez García (Tel. 5554870900 extensión 5870, Cel. 55 82335845)

Si Usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ Dr. Arturo Galindo Fraga, teléfono: 54870900 ext. 6101).

### DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

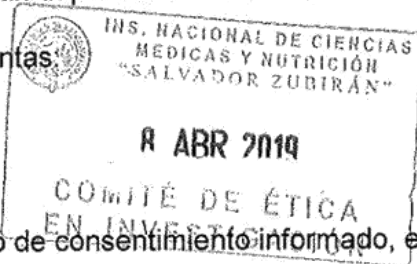
Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas (heces) para ser utilizadas en este estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

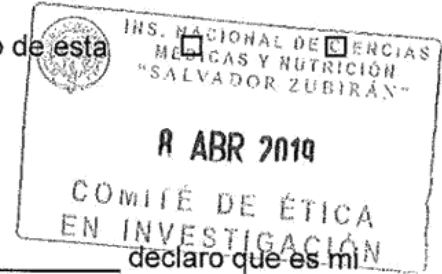
Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas:



	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
a. ¿Ha leído y entendido el formato de consentimiento informado, en su lengua materna?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. ¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Ha discutido usted otras opciones de tratamiento con el médico participante en el estudio y entiende usted que otras opciones de tratamiento están a su disposición?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- |   | SÍ<br>(marque<br>por<br>favor) | NO<br>(marque<br>por<br>favor) |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| j. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que usted no siguió los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés? | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| k. ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |
| m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento para sus registros personales?  | <input type="checkbox"/>       | <input type="checkbox"/>       |



**Declaración del paciente:** Yo,

\_\_\_\_\_ declaro que es mi  
decisión participar como sujeto de investigación clínica en el estudio. Mi participación es voluntaria.

Se me ha informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el INCMNSZ y no sufriré perjuicio en mi atención médica ni en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en este estudio. También puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si así los solicito.

Si tengo preguntas sobre el estudio, puedo ponerme en contacto con el Dr. José Sifuentes Osornio, Dra. Karla María Tamez Torres en el INCMNSZ (Tel. 5554870900 extensión 5870 Cel. 81 1183 8084), Dr. Esteban Pérez García (Tel. 5554870900 extensión 5870, Cel. 55 82335845)

Debo informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud (por ejemplo, uso de nuevos medicamentos, cambios en el consumo de tabaco) o en la ciudad donde resido, tan pronto como sea posible.

He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Tengo claro que en caso de tener preguntas sobre mis derechos como sujeto de investigación clínica en este estudio, problemas, preocupaciones o dudas, y deseo obtener información adicional, o bien, hacer comentarios sobre el desarrollo del estudio, tengo la libertad de hablar con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga, Tel: 54870900 ext. 6101).

\_\_\_\_\_  
Nombre del / de la Participante

\_\_\_\_\_  
Firma del / de la Participante

Fecha

Coloque la huella digital del participante sobre esta línea si no sabe escribir

Nombre del representante legal (si aplica)

Firma del representante legal

Fecha

Nombre del Investigador que explicó el documento

Firma del Investigador

Fecha

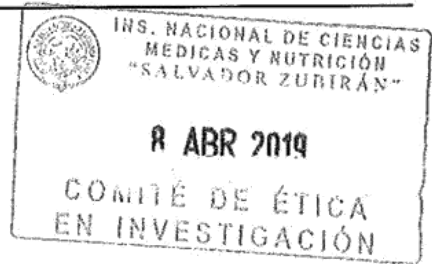
Nombre del Testigo 1

Firma del Testigo 1

Fecha

Relación con el participante:

Dirección:



Nombre del Testigo 2

Firma del Testigo 2

Fecha

Relación con el participante:

Dirección:

Lugar y Fecha:

**(El presente documento es original y consta de 11 páginas)**

